

Université de Montréal

Effets de l'expression de l'hydrogénase NAD-dépendante de
Ralstonia eutropha et des limitations d'azote et de phosphate
sur la production d'hydrogène chez *Escherichia coli*

par
Ariane Bisailon

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'optention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

août 2005

© Ariane Bisailon, 2005



W

4

US8

2006

V.02-2

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Effets de l'expression de l'hydrogénase NAD-dépendante de
Ralstonia eutropha et des limitations d'azote et de phosphate
sur la production d'hydrogène chez *Escherichia coli*

présenté par :
Ariane Bisaillon

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Georges Szatmari
président-rapporteur

Patrick Hallenbeck
directeur de recherche

Marc Drolet
membre du jury

SOMMAIRE

Chez *Escherichia coli*, la formiate-hydrogène lyase décompose le formiate pour produire de l'hydrogène. Cependant, la culture de *E. coli* se prête difficilement à la production en masse d'hydrogène en raison de son faible rendement, éliminant du coup toute utilisation pratique. Nos travaux consistaient donc à vérifier la validité de différents modèles de production d'hydrogène par fermentation de *E. coli*, dans le but d'en améliorer le rendement.

Les différentes fermentations de *E. coli* sont régulées en fonction des conditions du milieu, ce qui permet à l'organisme de s'adapter et de produire la plus grande quantité d'ATP possible et de maintenir un équilibre entre oxydations et réductions. Nous avons donc évalué les effets des limitations d'azote et de phosphate sur la croissance, la production d'hydrogène et le rendement de la production d'hydrogène de cultures en lot et continues. Nos travaux ont permis de démontrer que le rendement se trouvait amélioré lorsque l'azote ou le phosphate étaient limitants.

Une seconde approche consistait à modifier le métabolisme afin d'accroître la production d'hydrogène. Un système d'expression de l'hydrogénase NAD-dépendent (SH) de la bactérie gram-négatif, chemolithotrophe *Ralstonia eutropha* H16 a d'abord été introduit chez *E. coli*. Les quatre sous-unités de l'enzyme ont été détectées par immunobuvardage, démontrant son expression chez *E. coli*. Le dosage d'activité par spectrophotométrie des extraits cellulaires a ensuite indiqué un faible taux d'activité de réduction du NAD. La production d'hydrogène par la souche FTAB4 portant le plasmide d'expression pour SH et mutée pour une enzyme qui oxyde le NADH, l'alcool déshydrogénase, a été mesurée dans le but d'augmenter la disponibilité du substrat et s'est finalement avérée négative. En outre, le système régulateur du cycle de Krebs, ArcAB, a été inhibé dans le but de rendre disponible en anaérobie comme substrat un excès de pouvoir réducteur provenant du cycle d'acide citrique sous forme de NADH. Aucune molécule d'hydrogène n'a été détectée pour la souche *E. coli* FTAB5 portant le plasmide d'expression pour SH et mutée pour ArcA.

Mots clés : *Escherichia coli*, hydrogène, fermentation, hydrogénase NAD-dépendante,
ArcAB

ABSTRACT

Hydrogen can be produced from the degradation of formic acid by an enzyme of the mixed acid fermentation pathway, formate hydrogen-lyase. During growth of the *Escherichia coli* cell, energy efficiency and redox equilibrium are favoured over hydrogen production. As a consequence, mass production of hydrogen by the fermentation route is impractical. In this work, we investigated different approaches likely to enhance the efficiency of hydrogen production by *E. coli* fermentation.

We have examined the effects of various nutrient concentrations on growth, hydrogen production and hydrogen yield of both batch and continuous cultures. The nutrients studied were nitrogen and sulphur. The highest hydrogen yield was attained when cultured at limiting concentrations of ammonia. Lowering the concentration of phosphate increased the hydrogen yield.

A plasmid containing the genes coding for the NAD-dependent hydrogenase (SH) of the gram-negative chemolithotroph *Ralstonia eutropha* H16 was constructed for expression in *E. coli*. The four sub-units of the enzyme were detected by SDS-page analysis, demonstrating heterologous expression. Enzyme activity assays of soluble extracts revealed low NAD reducing activity. The hydrogen production by SH was verified in a *E. coli* strain, FTAB4, mutated for a NADH oxidising enzyme, alcohol dehydrogenase. To verify if an increase in NADH resulting from the Krebs cycle activity during anaerobic growth can serve as a substrate for hydrogen production, the hydrogen production by SH in an *E. coli* strain, FTAB5, mutated for ArcA was assayed. A mutation affecting the two component systems ArcAB relieves the inhibition of the synthesis of enzymes that make up the Krebs cycle. Attempts to produce hydrogen in strains of *E. coli* carrying the plasmid were unsuccessful.

Keywords : *Escherichia coli*, hydrogen, fermentation, NAD-dependant hydrogenase,
ArcAB

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
ABSTRACT	v
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiv
REMERCIEMENTS	xvii
1. INTRODUCTION	1
1.1 Métabolisme de la respiration et de la fermentation	3
1.1.1 Chaînes respiratoires	3
1.1.2 Respiration avec ou sans oxygène	3
1.1.3 Réduction du NADH par le cycle de Krebs	4
1.1.4 Réactions de la fermentation acide mixte	5
1.1.5 L'équilibre rédox	7
1.2 Régulation du métabolisme de la respiration par l'oxygène	8
1.2.1 Gènes du métabolisme de la respiration régulés par l'oxygène	8
1.2.2 ArcAB	9
1.2.3 Fnr	11
1.3 Hydrogénases	12
1.3.1 Caractéristiques générales des hydrogénases	12
1.3.2 [NiFe]-hydrogénases	13
1.4 Métabolisme de l'hydrogène chez <i>E. coli</i>.....	14
1.4.1 Les hydrogénases de <i>E. coli</i>	14
1.4.2 Organisation génétique	15
1.4.3 Maturation des hydrogénases	17
1.4.4 Régulation de l'expression de Hyd1 et Hyd2	19
1.4.5 Régulation de l'expression de FHL	19
1.4.6 Régulation de l'expression des gènes de maturation	20

1.5 Le métabolisme de l'hydrogène chez <i>R. eutropha</i> H16.....	20
1.5.1 Les hydrogénases de <i>R. eutropha</i> H16	20
1.5.2 Organisation génétique	22
1.5.3 Régulation de l'expression de SH et MBH	23
1.6 Projet de recherche	25
 2. MATÉRIEL ET MÉTHODE	 26
2.1 Souches bactériennes, plasmides et milieux utilisés	27
2.2 Conditions de culture	27
2.2.1 Culture anaérobie en lot	27
2.2.2 Culture anaérobie en continu	29
2.2.3 Culture des souches de <i>E. coli</i> contenant le plasmide pAB15	29
2.3 Manipulation de l'ADN	30
2.3.1 Extraction de l'ADN plasmidique	30
2.3.2 Amplification par PCR	30
2.3.3 Digestion par des enzymes de restriction	30
2.3.4 Extraction de l'ADN à partir d'un gel d'agarose	31
2.3.5 Méthode de ligation	31
2.4 Transformation	31
2.4.1 Préparation de cellules thermocompétentes fraîches	31
2.4.2 Transformation chimique	31
2.5 Transduction généralisée	32
2.5.1 Préparation du lysat phagique de P1 _{vir} liquide	32
2.5.2 Transduction avec un lysat phagique de P1 _{vir}	32
2.6 Construction des plasmides et des souches	33
2.6.1 Construction de pTRC99A-SH ⁺	33
2.6.2 Construction des souches avec $\Delta adhE$ et $\Delta arcA$	33
2.7 Méthodes de l'analyse des protéines	34
2.7.1 Expression et extraction des protéines	34
2.7.2 Électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS	35
2.7.3 Transfert des protéines par Western blot	35

2.7.4 Hybridation avec des anticorps	35
2.7.5 Détection de la présence de protéines	36
2.8 Dosages	36
2.8.1 Dosage de l'activité enzymatique de SH	36
2.8.2 Dosage de l'hydrogène	36
2.8.3 Dosage du glucose	37
3. RÉSULTATS	38
3.1 Production de H₂ avec différentes souches et milieu M9 tamponné en condition de croissance en lot	39
3.1.1 Comparaison de la production de H ₂ pour les souches <i>E. coli</i> BW545 et JW135	39
3.1.2 Comparaison de la production de H ₂ de la souche <i>E. coli</i> JW135 dans les milieux minimaux M9 et M9 tamponné	40
3.2 Effets des concentrations d'azote et de phosphate en condition de croissance en lot	40
3.2.1 Effets de la concentration d'azote	41
3.2.2 Effets de la concentration de phosphate	44
3.3 Effets des limitations d'azote et de phosphate en condition de croissance en continu	47
3.3.1 Effets du taux de dilution en condition de limitation d'azote	48
3.3.2 Effets du taux de dilution en condition de limitation de phosphate	49
3.4 Clonage des gènes <i>hoxFUYHWI</i> et <i>hypA2B2F2</i> dans pTRC99A	52
3.4.1 Insertion du site de restriction <i>Xba</i> I	52
3.4.2 Clonage dans le plasmide d'expression pTRC99A	53
3.5 Production de H₂ par l'hydrogénase NAD-dépendante de <i>R. eutropha</i> H 16 exprimée chez <i>E. coli</i>	55
3.5.1 Expression de SH chez <i>E. coli</i>	55
3.5.2 Activité enzymatique de SH	56
3.5.3 Production de H ₂ par SH	57
3.5.4 Effet des mutations $\Delta adhE$ et $\Delta arcA$ sur la production de H ₂ par SH ..	57
DISCUSSION	59
CONCLUSION	68

BIBLIOGRAPHIE	70
----------------------------	-----------

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Régulation de la transcription par Fnr et ArcA des enzymes du métabolisme de la respiration	10
Tableau II	Fonction des produits des gènes des opérons <i>hya</i> et <i>hyb</i>	16
Tableau III	Fonction des produits des gènes de l'opéron <i>hyc</i>	17
Tableau IV	Fonction des produits des gènes de l'opéron <i>hyp</i>	17
Tableau V	Génotypes et provenances des souches bactériennes utilisées	28
Tableau VI	Caractéristiques et provenances des plasmides utilisés	28
Tableau VII	Concentrations des produits ajoutés	28
Tableau VIII	Quantité de H ₂ produite par les souches de <i>E. coli</i> sauvage BW545 et mutante JW135	39
Tableau IX	Quantité de H ₂ produite par la souche <i>E. coli</i> JW135 dans les milieux M9 et M9 tamponné	40
Tableau X	Activité de réduction du NAD par différentes souches bactériennes	56
Tableau XI	Production de H ₂ par différentes souches de <i>E. coli</i>	58

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Cycle de Krebs	5
Figure 2	Fermentation acide mixte	7
Figure 3	Représentation schématique de ArcB et ArcA	11
Figure 4	Schéma du site actif de [NiFe]-hydrogénase de <i>Desulfovibrio gigas</i>	14
Figure 5	Organisation génétique de la région du chromosome de <i>E. coli</i> codant pour <i>hyc</i> et <i>hyp</i>	15
Figure 6	Modèle du site actif de SH de <i>R. eutropha</i> H16	21
Figure 7	Organisation génétique de la région du chromosome de <i>R. eutropha</i> H16 codant pour les gènes <i>hyp</i> et <i>hox</i>	22
Figure 8	Représentation schématique de SH de <i>R. eutropha</i> H16	23
Figure 9	Croissance en lot de la souche <i>E. coli</i> JW135 en fonction de la concentration d'azote	41
Figure 10	Quantité de H ₂ produit par la souche <i>E. coli</i> JW135 en lot en fonction de la concentration d'azote	42
Figure 11	Quantité de H ₂ produit par la souche <i>E. coli</i> JW135 en lot divisée par la DO ₅₅₀ en fonction de la concentration d'azote	43
Figure 12	Rendement de la production de H ₂ par la souche <i>E. coli</i> JW135 en lot en fonction de la concentration d'azote	44

Figure 13 Croissance en lot de la souche <i>E. coli</i> JW135 en fonction de la concentration de phosphate	45
Figure 14 Quantité de H ₂ produit par la souche <i>E. coli</i> JW135 en lot en fonction de la concentration de phosphate	46
Figure 15 Quantité de H ₂ divisé par la DO ₅₅₀ en fonction de la concentration de phosphate	46
Figure 16 Rendement de la production de H ₂ par la souche <i>E. coli</i> JW135 en lot en fonction de la concentration d'azote	47
Figure 17 Effet de la limitation d'azote sur la croissance de la souche <i>E. coli</i> JW135 en continu en fonction du taux de dilution	50
Figure 18 Effet de la limitation d'azote sur la production de H ₂ de la souche <i>E. coli</i> JW135 en continu en fonction du taux de dilution	50
Figure 19 Effet de la limitation d'azote sur le rendement de la production de H ₂ de la souche <i>E. coli</i> JW135 en continu en fonction du taux de dilution	50
Figure 20 Effet de la limitation de phosphate sur la croissance de la souche <i>E. coli</i> JW135 en continu en fonction du taux de dilution	51
Figure 21 Effet de la limitation de phosphate sur la production de H ₂ <i>E. coli</i> JW135 en continu en fonction du taux de dilution	51
Figure 22 Effet de la limitation de phosphate sur le rendement de la production de H ₂ de la souche <i>E. coli</i> JW135 en continu en fonction du taux de dilution	51
Figure 23 Fragment de 2,6 kb de l'opéron <i>hoxS</i> de <i>R. eutropha</i> H16 avec site de restriction <i>Xba</i> I amplifié par PCR	53

Figure 24 Vérification de la construction des plasmides A. pAB3, B. pAB13 et C. pAB15	54
--	----

Figure 25 Expression de SH chez <i>E. coli</i>	56
---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A : adénine
ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine diphosphate
AMP : adénosine 5'-monophosphate
Ap : ampicilline
ARN : acide ribonucléique
Asp : acide aspartique (voir aussi D)
ATP : adénosine triphosphate
bp : paire(s) de bases
C : cytosine
C : cystéine (voir aussi Cys)
CG : chromatographie en phase gazeuse
C-terminal : carboxy-terminal
Cys : cystéine (voir aussi C)
D : acide aspartique (voir aussi Asp)
DO₅₅₀ : densité optique à 550nm
DO₄₃₆ : densité optique à 436nm
DO₃₆₅ : densité optique à 365nm
DMSO : diméthylsulfoxyde
dNTP : quatre désoxyribonucléosides triphosphates
EDTA : acide éthylènediamine tétraacétique
FDHh : formiate déshydrogénase
FHL : formiate hydrogène-lyase
G : guanine
G: glycine
GTP : guanine triphosphate
H : histidine (voir aussi His)
His : histidine (voir aussi H)
Hyd : hydrogénase

IgG : immunoglobuline G

K : lysine

kb : kilobase

kDa : kiloDalton

Km : kanamycine

L : leucine

lacZ : gène de la β -galactosidase

LB : Luria-Bertani

M : molaire

mA : milliampère

MBH : hydrogénase membranaire

MES : acide morpholino-2-éthanesulfonique hydrate

mM : millimolaire

mol : mole

MOPS : 3-(N-morpholino) propane sulfonique

mV : millivolt

NB : bouillon nutritif

nm : nanomètre

nmol : nanomole

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

nt : nucléotide

N-terminal : amino-terminal

ori : origine de réplication

ORF : phase ouverte de lecture

P : phénylalanine

PBS : tampon phosphate salin

PCR : réaction de polymérase en chaîne

PDH : pyruvate déshydrogénase

PFL : pyruvate formiate lyase

pH : potentiel d'hydrogène

PVDF : polyvinylidène difluoride

R : argénine

r : résistance

Rnase : ribonucléase

rpm : révolution par min

S : sérine

SDS : sodium dodécyl sulfate

SDS-PAGE : électrophorèse en gel polyacrylamide avec SDS

SH : hydrogénase cytoplasmique NAD-dépendante

T : thymine

T : thréonine

TAE : tampon Tris-Acétate-EDTA

TBS : Tris-Buffered Saline

TBST : Tris-Buffered Saline avec Tween 20

Tc : tétracycline

TMAO : triméthylamine N-oxyde

U : uracile

V : volt

° C : degré Celsius

µg : microgramme

µl : microlitre

µM : micromolaire

µmol : micromole

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier M. Patrick Hallenbeck d'avoir dirigé mes travaux. Son aide et ses conseils tout au long de mon travail ont permis de mener à bien ce mémoire. Je lui exprime toute ma gratitude. J'ai grandement bénéficié de son expérience et de ses riches connaissances.

Je suis reconnaissante envers les membres du laboratoire de M. Hallenbeck que j'ai côtoyés : mes remerciements s'adressent à Amélie Pelletier, Jonathan Turcot et tout particulièrement Pier-Luc Tremblay, qui ont rendu ces deux dernières années très agréables.

Enfin, j'éprouve une reconnaissance toute spéciale envers Dominic Boulerice pour son soutien constant et ses critiques constructives.

1. Introduction

La demande énergétique mondiale s'en allant toujours croissante, l'on est en droit de s'interroger sur l'éventualité d'une pénurie d'énergie. En effet, les réserves de pétrole, qui constitue la principale source énergétique à hauteur de 80%, ne sont pas illimitées : les prévisions anticipent la mise à sec de la ressource dans quelque 50 années (DOE/EIA, 2000). En plus d'être une source d'énergie non renouvelable, la combustion du pétrole émet des gaz à effet de serre qui sont néfastes tant pour l'environnement que pour la santé. Face à cette situation, il est souhaitable de diminuer notre dépendance pétrolière et d'envisager des sources d'énergie alternatives à la fois renouvelables et non polluantes (Dunn, 2002).

L'hydrogène représente à ce titre une source énergétique des plus prometteuses. À poids égal, l'hydrogène produit trois fois plus d'énergie que l'essence et sept fois plus que le charbon. En fait, l'hydrogène possède la plus importante densité énergétique des combustibles connus. L'hydrogène possède surtout les grands avantages d'être propre et renouvelable, sa combustion ne produisant que de la vapeur d'eau. Il y a cependant un bémol : les procédés actuels de production d'hydrogène consomment beaucoup d'énergie. À ce jour, on produit l'hydrogène par reformage à la vapeur du gaz naturel ou de l'huile, par gazéification du charbon ou par électrolyse de l'eau. En plus d'être énergivores, ces techniques peuvent s'avérer des sources de pollution (Levin et collab., 2004). Il demeure donc impératif de développer des méthodes de production plus propres et plus économiques afin de tirer profit de cette source d'énergie qui s'annonce somme toute des plus prometteuses.

La production d'hydrogène par voie biologique pourrait être une alternative. Entre autres moyens, l'hydrogène biologique peut être produit par fermentation bactérienne. Jusqu'à présent, cette méthode était quelque peu délaissée en raison de son faible rendement; en fait, elle se doit d'être grandement améliorée si l'on veut faire une production de masse. La production d'hydrogène par fermentation acide mixte de *E. coli* comporte plusieurs avantages. Premièrement, la facilité de cultiver cette espèce dans un réacteur fermé rend son utilisation pratique pour une production de masse. Ensuite, le génome de *E. coli* est le mieux caractérisé, rendant possible une multitude de manipulations génétiques. Par

exemple, des voies métaboliques peuvent être modifiées pour augmenter la disponibilité d'électrons.

1.1 Métabolismes de la respiration et de la fermentation

1.1.1 Chaînes respiratoires

La respiration consiste en l'oxydation d'un composé donneur par une chaîne de transport d'électrons en présence d'un accepteur terminal. Le transfert d'électrons est couplé à la synthèse d'ATP par le mécanisme de la phosphorylation oxydative. Les chaînes respiratoires d'*E. coli* sont formées de déshydrogénases primaires et de réductases ou oxydases terminales liées entre elles par des quinones. De celles-ci, on retrouve 15 déshydrogénases primaires, 10 oxydo-réductases terminales et trois types de quinones : l'ubiquinone, le ménaquinone et le diméthylménaquinone (Unden et Bongaerts, 1997).

Différentes chaînes respiratoires permettent d'accommoder divers donneurs d'électrons, tels le NADH, le formiate, l'hydrogène, le glycérol-3P ainsi que plusieurs accepteurs d'électrons, tels l'oxygène, le nitrate, le fumarate, le triméthylamine N-oxyde (TMAO) et le diméthylsulfoxyde (DMSO). La composition des chaînes respiratoires est régulée au niveau de la transcription, notamment par l'oxygène et le nitrate, de manière à optimiser la production d'énergie et le taux de croissance (Unden et Bongaerts, 1997; Gunsalus, 1992).

1.1.2 Respiration avec ou sans oxygène

La respiration sur O₂ est la plus favorable en raison du potentiel élevé de l'oxygène de +818 mV (Pelmont, 1993, p. 605). En croissance aérobie, le NADH alimente la chaîne respiratoire en électrons grâce aux NADH déshydrogénases I et II. La NADH déshydrogénase I couple l'oxydation du NADH à la translocation de deux protons par électron. Les transporteurs terminaux *d* et *o* sont respectivement utilisés en basse et en forte oxygénation. Le cytochrome *o* est énergiquement plus favorable mais a une plus

basse affinité pour l'O₂. Le transfert d'électrons des déshydrogénases aux cytochromes est relié par l'ubiquinone (Gunsalus, 1992).

En absence d'oxygène, l'utilisation du nitrate est favorisée. Le potentiel du nitrate de +433 mV est plus élevé que celui des autres accepteurs, soit le DMSO (+160 mV), le TMAO (+130 mV) et le fumarate (+30 mV). En présence de nitrate, le diméthylménaquinone transfère les électrons tandis que le ménaquinone effectue la même opération dans le cas des autres accepteurs d'électrons (Pelmont, 1993, p. 605).

Lorsqu'aucun accepteur d'électrons n'est disponible pour la respiration, la fermentation sert à maintenir un équilibre entre la quantité de NADH produite par la glycolyse et la quantité de NADH consommée. La fermentation acide mixte consiste en l'oxydation du pyruvate en différents produits. Elle est utilisée en dernier recours parce qu'elle entraîne la perte d'une bonne partie du carbone et de l'hydrogène pour la croissance. De plus, le rendement énergétique est médiocre puisque l'ATP est uniquement produit par phosphorylation au niveau du substrat (Clark, 1989).

1.1.3 Réduction du NADH par le cycle de Krebs

En condition aérobie, le cycle de Krebs produit le NADH utilisé par la chaîne respiratoire. Huit enzymes forment la voie métabolique qui catalyse la complète oxydation de l'acétyl-coenzyme A à 8 électrons avec une variation énergétique suffisante pour faire 10 à 12 ATP (Pelmont, 1993, p. 613) (fig. 1).

Lorsque les besoins de NADH diminuent, comme c'est le cas en anaérobie, le cycle de Krebs ne fonctionne pas en entier. La 2-oxoglutarate est absente et le niveau de toutes les autres enzymes est réduit de 10 à 20 fois. L'activité réduite du cycle permet la biosynthèse du 2-oxoglutarate et du succinyl-CoA (Neidhardt, 1996, p. 206-07).

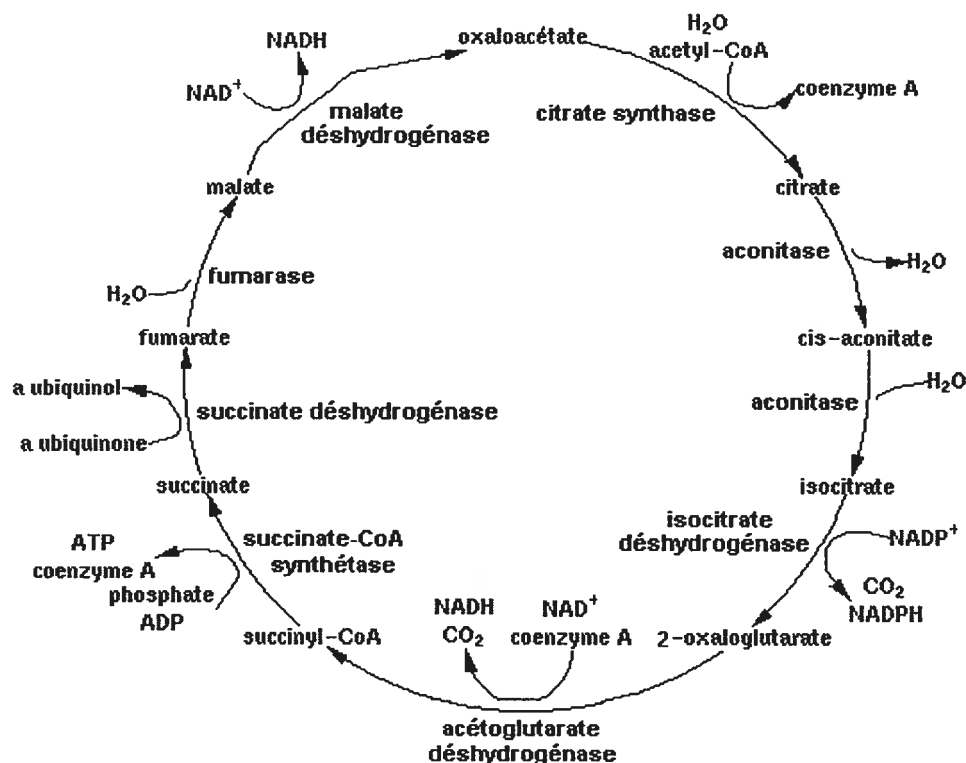


Figure 1. Cycle de Krebs (d'après EcoCyc, 2005b)

1.1.4 Réactions de la fermentation acide mixte

Lorsqu'aucune source d'accepteur d'électrons est présente, la fermentation acide mixte recycle le NADH produit par la glycolyse. Cette fonction est essentielle pour permettre à la glycolyse de se poursuivre et pour maintenir l'équilibre rédox (Clark, 1989). Les réactions de la fermentation acide mixte réduisent le pyruvate en différents produits : le D-lactate, l'acétate, l'éthanol, le formiate, le succinate, le CO₂ et le H₂ (fig. 2). À un pH alcalin, les principaux produits de la fermentation sont l'acétate, l'éthanol et le formiate. Lorsque le pH intracellulaire baisse, la décomposition du formiate en CO₂ et H₂ et la production du lactate augmentent afin de ralentir l'acidification du milieu.

La pyruvate formiate lyase (PFL) catalyse la conversion du pyruvate en formiate et en acétyl-CoA. En aérobie, l'enzyme responsable de la production d'acétyl-CoA à partir du

pyruvate est la pyruvate déshydrogénase (PDH). Parce que la PDH réduit le NAD, l'inhibition de cette enzyme au profit de la PFL en condition de fermentation diminue le besoin de réoxyder du NADH (Knappe et Sawers, 1990).

La voie de dégradation de l'acétyl-CoA en acétate permet de récupérer l'énergie du lien thioester sous la forme d'une molécule d'ATP. Par contre, cette voie n'oxyde pas le NADH. La voie ne fonctionne pas lorsque celui-ci est en forte concentration puisque le NADH est un inhibiteur allostérique de l'enzyme qui convertit l'acétyl CoA en acétyl phosphate, la phosphotransacétylase (Suzuki, 1969). Alternativement, l'acétyl-CoA est réduit en éthanol par l'alcool déshydrogénase. Cette réaction oxyde deux molécules de NADH.

Le formiate produit par la PFL est dégradé en H_2 et en CO_2 par le complexe formiate hydrogène-lyase (FHL). Ce complexe FHL est composé de la formiate déshydrogénase (FDHh) et de l'hydrogénase 3 (Hyd3) (Axley et collab., 1990; Bohm et collab., 1990). L'expression du complexe FHL est induite par le formiate et un pH acide. Son activité est induite par le formiate. (Rossmann et collab., 1991). Le H_2 produit est excrété de la cellule ou possiblement réoxydé par les hydrogénases 1 et 2.

Lorsque le pyruvate est en forte concentration et que le pH est acide, le pyruvate est réduit en lactate par la lactate déshydrogénase. L'enzyme est présente en condition aérobie mais son expression est augmentée de cinq à dix fois en anaérobiose à bas pH (Mat-Jan et collab., 1989). Son activité est induite par le pyruvate (Tarmy et Kaplan, 1968).

La voie de production du succinate commence par la condensation du phosphoénolpyruvate et du CO_2 pour former l'oxaloacétate. La réaction est catalysée par la phosphoénolpyruvate carboxylase. Des réactions de réduction catalysées par la malate déshydrogénase, la fumarase et la fumarate réductase réduisent l'oxaloacétate en succinate. La voie de production du succinate consomme deux H_2O et deux NADH par molécule de glucose consommée.

L'importance du taux des différents produits dans l'équilibre rédox est mise en évidence par des mutations des voies de fermentation. Un mutant du gène de la phosphotransacétylase, *pta*, ne produit pas d'acétate et est incapable de croître en condition de fermentation (Guest, 1979). Pareillement, un mutant *adhE*, déficient pour l'alcool déshydrogénase, ne croît pas avec les substrats réduits. Une souche mutée ne croît pas avec le glucose, le sorbitol et le gluconate mais croît avec le glucuronate (Clark et Cronan, 1980). Un double mutant *adhE* et *pta* retrouve la capacité de croître avec du glucose mais pas avec les substrats plus ou moins réduits. Chez ce mutant, la voie de production du lactate, qui consomme deux NADH, est utilisée pour recycler les deux NADH produits de l'oxydation du glucose (Gupta et Clark, 1989).

1.2 Régulation du métabolisme de la respiration par l'oxygène

1.2.1 Gènes du métabolisme de la respiration régulés par l'oxygène

Le passage de l'aérobiose à l'anaérobiose s'accompagne de profonds changements dans la composition cellulaire des protéines. Ces changements sont nécessaires afin d'utiliser la chaîne respiratoire la plus favorable en terme de croissance et de rendement énergétique selon les conditions de croissances (Unden et Bongaerts, 1997). La régulation transcriptionnelle en réponse au niveau d'oxygène est contrôlée par le système à deux composantes ArcAB (*aerobic respiratory control*) et le senseur-régulateur Fnr (*fumarate and nitrate reductase regulation*) (Lynch et Lin, 1996; Green et collab., 1991). Le tableau I résume les effets de ces régulateurs sur la transcription des gènes codant pour les principales enzymes du métabolisme de la respiration.

Au moins 40 opérons sont sous le contrôle du système ArcAB (Liu et Wulf, 2004). ArcA est le principal régulateur du métabolisme aérobie. La protéine agit comme répresseur de la respiration aérobie, des enzymes des cycles de Krebs et du glyoxylate en absence de O₂.

En 1976, une mutation affectant la synthèse des nitrite, nitrate et fumarate réductases fut découverte (Lambden et Guest, 1976). Le gène responsable était *fnr*. Aujourd'hui, plus de 70 gènes distribués dans 31 opérons sont reconnus comme étant régulés par Fnr. L'analyse du profil d'expression des gènes à l'aide des puces à ADN indique que ce nombre pourrait s'élever à plus d'une centaine (Kang et collab., 2005; Salmon et collab., 2003). Fnr agit principalement comme activateur des gènes de la respiration anaérobie. Parmi les produits des gènes régulés positivement par Fnr, l'on retrouve les enzymes de l'oxydation anaérobie du glycérol et du formiate, les enzymes de la réduction des accepteurs d'électrons alternatifs comme le nitrate, la fumarate et le DMSO ainsi que les enzymes impliqués dans leur transport. Fnr est aussi un régulateur positif de ArcA. Fnr réprime l'expression des gènes de la respiration aérobie comme ceux codant pour les cytochromes oxydase *o* et *d* et la NADH déshydrogénase II. Fnr réprime sa propre expression (Compan et Touati, 1994).

1.2.2 ArcAB

ArcA est un régulateur de réponse cytoplasmique de la sous-famille OmpR. Sous sa forme phosphorylée, ArcA lie l'ADN par son motif hélice-boucle-hélice et peut activer ou réprimer la transcription des gènes cibles. Une séquence signature de 7 pb, 5'-TATTTaa-3', pour la reconnaissance du promoteur a été proposée suite à des expériences de protection DnaseI du promoteur *pflA* (Drapal et Sawers, 1995).

La protéine ArcB fait parti de la sous-famille des kinases senseurs tripartites. ArcB a trois domaines cytoplasmiques : deux domaines transmetteurs primaire (H1) et secondaire (H2) et un domaine receveur (D1). En plus des domaines cytoplasmiques, ArcB est composée de deux hélices alpha qui ancrent la protéine dans la membrane et d'un court segment périplasmique de 7 acides aminés (Iuchi et Lin, 1992; Kato et collab., 1997; Tsuzuki et collab., 1995) (fig. 3).

Tableau I. Régulation de la transcription par Fnr et ArcA des enzymes du métabolisme de la respiration (d'après Gunsalus et Park, 1994)

Enzyme	Gènes	Régulateur	
		Fnr	ArcA
Respiration aérobie			
pyruvate déshydrogénase	<i>aceEF, lpd</i>		
citrate synthase	<i>gltA</i>		-
Aconitase	<i>acn</i>		-
isocitrate déshydrogénase	<i>icd</i>		-
2-oxoglutarate déshydrogénase	<i>sucAB</i>		-
succinate -CoA synthétase	<i>sucCD</i>		-
succinate déshydrogénase	<i>sdhCDAB</i>	-	-
fumarase A	<i>fumA</i>		
malate déshydrogénase	<i>mdh</i>		-
Fermentation			
PEP carboxykinase	<i>ppc</i>		
lactate déshydrogénase	<i>ldhA</i>		
pyruvate formate lyase	<i>pfl</i>	+	+
formate-hydrogen lyase	<i>fdhF, hyc</i>		
alcool déshydrogénase	<i>adhE</i>		
Phosphotransacétylase	<i>pta</i>		
acétate kinase	<i>ackA</i>		
malate déshydrogénase	<i>mdh</i>		-
fumarase B	<i>fumB</i>	+	
fumarate réductase	<i>frdABCD</i>	+	
Chaîne respiratoire (oxidoréductases terminales)			
cytochrome <i>o</i> oxydase	<i>cyoABCDE</i>	-	-
cytochrome <i>d</i> oxydase	<i>cydAB</i>	-	+
nitrate réductase	<i>narGHJI</i>	+	
nitrite réductase	<i>nirB</i>	+	
DMSO/TMAO réductase	<i>dmsABC</i>	+	
TMAO réductase	<i>torA</i>	+	
fumarate réductase	<i>frdABCD</i>	+	
Autres			
NADH déshydrogénase	<i>ndh</i>	-	
formiate déshydrogénase-N	<i>fdnGHI</i>	+	
glycérol-P déshydrogénase	<i>glpD</i>		-
glycérol-P déshydrogénase	<i>glpACB</i>	+	
nitrite efflux	<i>nark</i>	+	
superoxide dismutase	<i>sodA</i>	-	-

Légende : + = activation
 - = répression

ArcB détecte indirectement la concentration d'oxygène. Le signal perçu n'est pas connu, mais il semble qu'il pourrait s'agir du NADH. En réponse à une chute de la concentration en O₂, le résidu His292 du domaine H1 de ArcB s'autophosphoryle. Le phosphate est ensuite transféré au résidu Asp576 de D1, au résidu His717 de H2 et finalement au résidu Asp54 du domaine H1 de ArcA.

En condition oxydative, ArcA est déphosphorylée. Le phosphate du résidu Asp54 de ArcA est d'abord transféré au His717 de ArcB puis au résidu Asp516 (Iuchi et Lin, 1992; Georgellis et collab., 1997; Georgellis et collab., 1998).

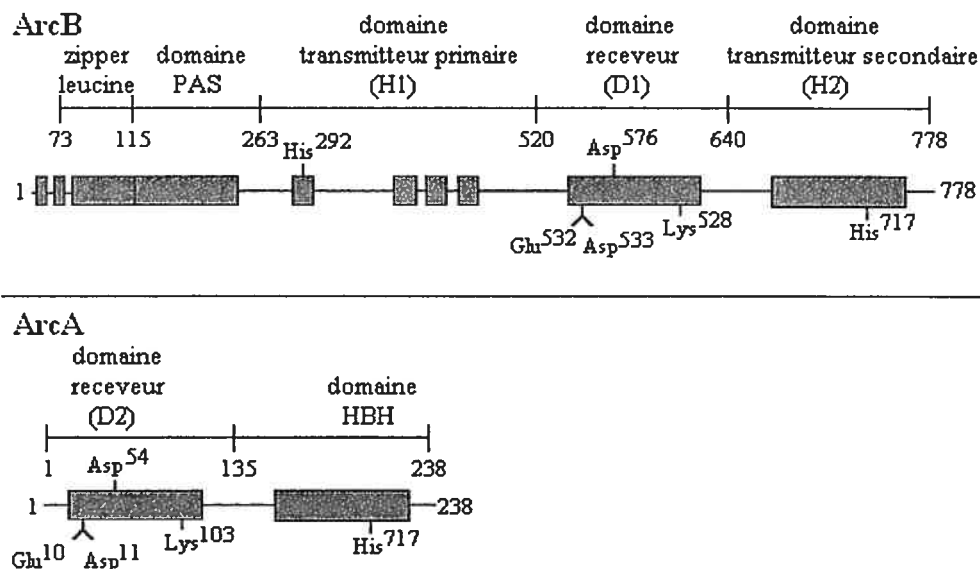


Figure 3. Représentation schématique de ArcB et ArcA (d'après Kwon et collab., 2000)

1.2.3 Fnr

Fnr a une forte homologie à la protéine CRP (*cyclic AMP receptor protein*). Fnr est constitué d'un domaine senseur et d'un domaine de régulation qui lie l'ADN. L'oxygène interagit directement avec un centre fer-soufre exposé à la surface de Fnr. Ce centre fer-soufre est lié à quatre résidus cystéines (Cys20, Cys23, Cys29, Cys122) de l'extension

N-terminale. Un taux élevé d'oxygène oxyde le centre (4Fe-4S) et inactive la protéine. Fnr est un monomère de 28 kDa dans son état inactif. Le mode d'activation de Fnr en condition anaérobie n'est pas connu mais pourrait impliquer la réduction du centre fer-soufre. Dans son état actif, Fnr forme un dimère capable de lier l'ADN (Green et collab., 1991). La séquence consensus pour la liaison de l'ADN de 22-bp est un palindrome partiel avec un demi motif 5'-TGAT-3' (Eiglmeier et collab., 1989).

1.3 Hydrogénases

1.3.1 Caractéristiques générales des hydrogénases

Les hydrogénases catalysent l'activation réversible de l'hydrogène selon la réaction :



Même si ces enzymes peuvent catalyser de manière réversible la réduction de protons en hydrogène, les conditions physiologiques forcent la réaction dans un sens plutôt que dans l'autre.

On retrouve les hydrogénases chez les bactéries sulfato-réductrices, photosynthétiques, entériques, méthanogènes et chez des archaebactéries hyperthermophiles. Les hydrogénases qui catalysent la production d'hydrogène sont présentes dans les bactéries anaérobies strictes ou facultatives. Chez les fermenteurs, la réduction des protons permet de recycler des transporteurs d'électrons nécessaires pour générer de l'ATP et pour maintenir un pH intracellulaire constant. Les hydrogénases qui catalysent l'oxydation de l'hydrogène se retrouvent chez les bactéries anaérobies strictes et facultatives ou aérobies. L'oxydation de l'hydrogène est couplée à la réduction d'un accepteur terminal d'électrons pour la production d'énergie par phosphorylation oxydative (Adam et collab., 1981).

Les hydrogénases peuvent être regroupées en deux grandes classes en fonction de leur contenu en métal : les [Fe]-hydrogénases (Adams, 1990) et les [NiFe]-hydrogénases (Albracht, 1994). Les [Fe]-hydrogénases sont présentes dans les bactéries anaérobies strictes productrices de H_2 comme *Clostridium pasteurianum* et *Desulfovibrio vulgaris*. Elles ont une seule unité et possèdent exclusivement des centres fer-soufre comme groupements prosthétiques. En plus des centres fer-soufre, les [NiFe]-hydrogénases possèdent un atome nickel au niveau du site actif. Plus communes, elles sont généralement des hétérodimères catalyseurs de l'oxydation d'hydrogène. Une petite sous-unité de 30 kDa environ contient au moins un, et dans plusieurs cas, jusqu'à trois centres fer-soufre (Armstrong, 2004; Evans et Pickett, 2003; Adams et Stiefel, 2000). Une grande sous-unité de 46-72 kDa contient les atomes de nickel et de fer du site actif. La plupart des [NiFe]-hydrogénases sont inactivées par l'oxygène et la réduction de l'enzyme est nécessaire pour son activation (Garcin et collab., 1999).

Toutes les hydrogénases partagent certaines caractéristiques. Leurs centres fer-soufre à proximité du site actif sont disposés selon un même axe de manière à permettre le flux d'électrons. Des ligands diatomiques, le monoxyde de carbone et le cyanure, présents dans le site actif, stabilisent la forme réduite de l'atome de fer. Les hydrogénases ont aussi une cavité hydrophobe qui relie le site actif à la surface. Ces canaux hydrophobes pourraient servir pour le stockage de H_2 et à son transport de la surface vers l'intérieur de la protéine et inversement (Peters et collab., 1998; Volbeda et collab., 1995).

1.3.2 [NiFe]-hydrogénases

Les séquences des petites sous-unités sont très peu conservées. Les hydrogénases membranaires et périplasmiques possèdent une séquence signal dans la région N-terminale de 32 à 50 résidus. Elles contiennent un motif de deux arginines successives, (S/T)-R-R-x-F-L-K. Ce motif, nécessaire pour la translocation, est présent dans toutes les protéines périplasmiques ayant des cofacteurs redox complexes tels que les centres fer-soufre, les cofacteurs à molybdène, à cuivre et à FAD. Le clivage de la séquence signal se fait à 21 acides aminés du motif (S/T)-R-R-x-F-L-K, après un résidu alanine très

conservé (Wu et collab., 2000). La grande sous-unité dépourvue d'un signal peptide est exportée avec la petite sous-unité.

Les séquences des grandes sous-unités sont très homologues. La grande sous-unité comporte deux motifs consensus : un motif N-terminal $RxCGxCxxxH$ et un motif C-terminal $DPCxxCxxH/R$ (Volbeda et collab., 1995). L'atome de nickel est lié par les quatre cystéines de ces deux motifs. Il est capable d'accueillir trois différents états d'oxydation. L'atome de fer est lié par les deuxièmes cystéines de chaque motif. Il est aussi lié par deux molécules de cyanure et une molécule de monoxyde carbone (Pierik et collab., 1999) (fig. 4).

Le peptide C-terminal maintient la protéine dans une conformation accessible aux métaux. Suite à l'insertion du nickel dans la grande sous-unité, l'extrémité C-terminale est clivée après le résidu histidine ou arginine du motif $DPCxxCxxH/R$. La perte du peptide C-terminal entraîne un changement de conformation qui permet l'internalisation du site actif (Theodoratou et collab., 2005).

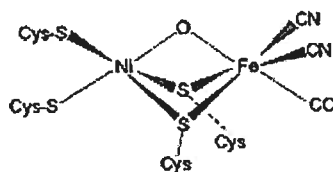


Figure 4. Schéma du site actif de [NiFe]-hydrogénase de *Desulfovibrio gigas* (Bleijlevens et collab., 2004)

1.4 Métabolisme de l'hydrogène chez *E. coli*

1.4.1 Les hydrogénases de *E. coli*

E. coli contient 4 hydrogénases, toutes du type NiFe (Vignais et collab., 2001). Il produit les hydrogénases 1, 2 et 3 en condition anaérobie (Sawers et collab., 1985).

L'hydrogénase 4 serait codée par un opéron de 10 gènes, *hyfA-J* (Andrews et collab., 1997). L'opéron est induit par la protéine HyfR. Par contre, à ce jour, ni la présence de l'hydrogénase 4, ni son activité enzymatique n'ont pu être démontrées (Self et collab., 2004).

Les hydrogénases 1 et 2 sont membranaires et elles sont exposées en grande partie au périplasme. Hyd1 est composée de deux sous-unités, l'une de 64 kDa et l'autre de 35 kDa. Hyd2 est composé de deux sous-unités de 35 et 61 kDa (Sawers et Boxer, 1986; Ballantine et Boxer, 1986). Hyd1 n'est pas essentielle pour la croissance. Elle pourrait servir à recycler l'hydrogène libéré par le complexe formiate hydrogène-lyase. Un autre rôle proposé pour Hyd1 est le transport d'électrons dans une voie métabolique où le formiate sert de donneur d'électrons et le fumarate d'accepteur d'électrons (Brondsted et Atlung, 1994). Un mutant déficient pour Hyd2 ne peut croître en anaérobie avec de l'hydrogène et du fumarate. Une hypothèse stipule que les électrons produits de l'oxydation de l'hydrogène par Hyd2 sont utilisés par la fumarate réductase pour réduire le fumarate en succinate (Sawers et collab., 1986; Menon et collab., 1994). Hyd3 est responsable de la production d'hydrogène. La protéine fait parti du complexe formiate hydrogène lyase de 80 kDa qui oxyde le formiate en CO₂. Son expression est induite par le formiate et un pH acide (Rossmann et collab., 1991).

1.4.2 Organisation génétique

Hyd1 est codée par l'opéron *hya* situé à la minute 22 du chromosome de *E. coli*, Hyd2 par l'opéron *hyb* situé à la minute 65 et Hyd3 par l'opéron *hyc* situé à proximité de l'opéron *hyp* à la minute 58-59 (fig. 5).

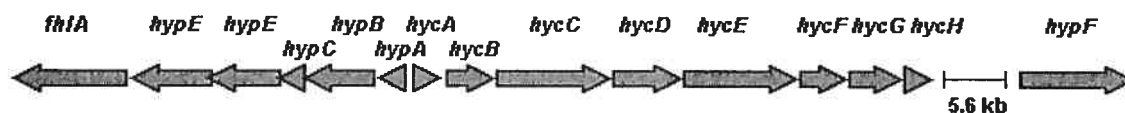


Figure 5. Organisation génétique de la région du chromosome de *E. coli* codant pour *hyc* et *hyp* (d'après Neidhardt, 1996, p. 270)

L'opéron *hya* compte 6 gènes, *hyaA-F* (Menon et collab., 1990). Les petite et grande sous-unités sont codées par *hyaA* et *hyaB* respectivement. Hyd1 est liée à HyaC, caractérisée comme étant le cytochrome *c*. HyaD est une protéase responsable du clivage du peptide C-terminale (Sawers et Boxer, 1986; Menon et collab., 1991).

L'opéron *hyb* compte huit gènes, *hybOABCDEFG*. HYD2 est composée de la petite sous-unité, HybO (plutôt que HybA, tel que suggéré par Menon en 1994) et de la grande sous-unité, HybC (Menon et collab., 1994; Sargent et collab., 1998). La fonction des produits des gènes des opérons *hya* et *hyb* est présentée dans le tableau II.

Tableau II. Fonction des produits des gènes des opérons *hya* et *hyb*

<i>E. coli</i> Hyd1	<i>E. coli</i> Hyd2	Fonction
HyaA	HybO	petite sous-unité
HyaB	HybC	grande sous-unité
HyaC	HybB	cytochrome <i>b</i>
HyaD	HybD	protéase
HyaE	HybE	maturation
HyaF	HybF	incorporation du nickel, homologie avec <i>hypA</i>
	HybG	incorporation du ligand CN, homologie avec <i>hypC</i>
	HybA	

Les gènes structuraux de l'hydrogénase 3 sont organisés dans un opéron de 9 gènes, *hycA-I* (Bohm et collab., 1990). Les petite et grande sous-unités sont respectivement codées par *hycG* et *hycE*. Les caractéristiques des ORFs de l'opéron *hyc* sont présentées dans le tableau III.

En plus des gènes structuraux codants pour les Hyd1-3, il y sept gènes de maturation, dont six gènes *hyp* (*hydrogenase pleiotropic acting genes*) (tableau IV). Les gènes *hypABCDE* se situent à la minute 58-59 du chromosome et le gène *hypF* est situé à 13kb de l'opéron *hyp* (Lutz et collab, 1991) (fig. 5).

Tableau III. Fonction des produits des gènes de l'opéron *hyc*

<i>E. coli</i>	Fonction
Hyd3	
HycA	inhibiteur de la formation du complex FHL
HycB	petite sous-unité de FDHh
HycC	
HycD	
HycE	grande sous-unité de Hyd3
HycF	
HycG	petite sous-unité de Hyd3
HycH	
HycI	protéase spécifique de HycE

Des mutations dans les gènes de l'opéron *hyp*, *hypB*, *hypD*, *hypE* et *hypF* affectent la maturation des trois hydrogénases de *E. coli*. Des mutations de *hypA* et *hypC* empêchent la maturation complète de Hyd3 seulement (Jacobi et collab., 1992). L'opéron *hyb* contient des gènes homologues à *hypA* et *hypC*. La séquence de *hybF* est similaire à celle de *hypA* de même que la séquence de *hybG* l'est à celle de *hypC* (Menon et collab., 1994). Les produits de ces gènes sont impliqués dans la maturation des hydrogénases 1 et 2 (Blokesch et collab., 2001; Hube et collab. 2002).

Tableau IV. Fonction des produits des gènes de l'opéron *hyp*

<i>E. coli</i>	Fonction
HypA	incorporation du nickel
HypB	incorporation du nickel
HypC	incorporation du ligand CN
HypD	incorporation du ligand CN
HypE	incorporation du ligand CN
HypF	incorporation du ligand CN

1.4.3 Maturation des hydrogénases

HypF est une carbamoyl transférase ATP-dépendente. La protéine catalyse la carbmoylation du résidu cystéine C-terminal de la protéine HypE en utilisant la carbamoylphosphate comme substrat. Ensuite, HypE déshydrate le thiocarboxamide dans une réaction ATP-dépendante et le déphosphoryle en thiocyanate. Le groupement

cyanure de HypE-thiocyanate est transféré au centre ferreux de la grande sous-unité des hydrogénases (Paschos et collab. 2002; Blokesch et collab. 2004).

HypC lie le précurseur de HycE (Drapal et Bock, 1998; Magalon et Bock, 2000). Lorsque le carbamoylphosphate est manquant, un complexe de HypC et HypD s'accumule (Blokesch et Bock, 2002). Un modèle stipule que le complexe de HypC-HypD est le site de liaison au fer du CN et peut-être aussi du CO. Une fois lié, le fer serait transféré par HypC à la grande sous-unité (Blokesch et Bock, 2002; Blokesch et collab., 2002).

Le produit du septième gène impliqué dans la maturation des hydrogénases d'*E. coli* est une endopeptidase qui clive le peptide C-terminal de la grande sous-unité. Chaque hydrogénase a une endopeptidase spécifique. Les endopeptidases HyaD, HybD et HycI clivent respectivement les hydrogénases 1, 2 et 3. (Fritsche et collab., 1999; Menon et collab., 1991; Rossmann et collab., 1995). Suite à l'incorporation du nickel, l'extrémité C-terminale est clivée après le résidu histidine ou arginine du motif DPCxxCxxH/R.

La dernière étape de la maturation, soit celle du clivage de l'extrémité C-terminale de la grande sous-unité, est conditionnelle à l'incorporation du nickel (Rossmann et collab., 1994). L'entrée du nickel dans la cellule et son incorporation dans la protéine doivent être contrôlées parce que le nickel génèrent des ions superoxydes très toxiques à l'état libre.

Chez *E. coli*, les protéines NikABCDE du type transporteur ABC, assurent le transport spécifique du nickel. Le nickel est essentiel à l'activité des hydrogénases. L'activité enzymatique est abolie chez des mutants *nik* et restaurée par l'addition de nickel en surplus dans le milieu (Navarro et collab., 1993). L'insertion du nickel est accomplie par les protéines HypA et HypB (Hube et collab., 2002). Une délétion des gènes *hypA* et *hypB* peut aussi être complétée en augmentant la concentration du nickel dans le milieu. HypB lie le nickel et le transfère à la grande sous-unité des hydrogénases. HypB a une activité GTPase pour se dissocier de l'hydrogénase (Maier et collab. 1995). HypA est une zinc métalloprotéine qui lie le nickel et forme un complexe avec HypB (Atanassova et Zamble, 2005). HybF aurait la fonction de HypA dans la maturation de Hyd1 et Hyd2.

1.4.4 Régulation de l'expression de Hyd1 et Hyd2

La synthèse de Hyd1 et Hyd2 est réprimée en présence d'oxygène et de nitrate (Ballantine et Boxer, 1985). L'expression des gènes de *hya* est induite par ArcA et AppY (Brondsted et Atlung, 1994). La synthèse de Hyd1 est induite en présence de formiate, réprimée par le nitrate et nécessite le facteur sigma RpoS. La réponse aux facteurs sigma RpoS et la régulation par AppY suggèrent que Hyd1 a un rôle dans la réponse au stress (Sawers et collab., 1985; King et Przybyla, 1999). La synthèse de Hyd2 est induite en condition de croissance anaérobie en absence d'une source de carbone fermentable. Son expression est régulée négativement par ArcA et augmente en présence de fumarate (Ballantine et Boxer, 1986; Richard et collab., 1999).

1.4.5 Régulation de l'expression de FHL

Le complexe FHL est exprimé en absence d'accepteur d'électrons tels que l'oxygène et le nitrate. Son expression nécessite le formiate et un pH acide. Les gènes de l'opéron *hyc* et le gène *fdhF*, qui codent pour la formiate déshydrogénase H, sont induits par l'activateur de la transcription FhlA (Rossmann et collab., 1991).

FhlA est responsable de l'induction par le formiate de la transcription de *hyc*, *hyp* et du gène *fdhF*. FhlA fait parti de la famille de régulateur de réponse des systèmes à deux composants NtrC. L'activation de la transcription des opérons *hyc* et *hyp*, par FhlA, a lieu sur un promoteur dépendant du facteur σ^{54} et nécessite l'activateur IHF (Hopper et Bock, 1995; Hopper et collab., 1996). La liaison du formiate à FhlA induit son activité ATPase nécessaire à l'activation de la transcription. L'induction du complexe formiate hydrogène lyase par le substrat prévient son accumulation à un niveau toxique et ralentit l'acidification du milieu (Rossmann et collab., 1991).

1.4.6 Régulation de l'expression des gènes de maturation

L'expression des gènes accessoires *nik* et *hyp* est régulée par Fnr (Lutz et collab., 1991).

La transcription de *hyp* en condition de croissance fermentative est induite par FhlA. Elle a lieu à partir d'un promoteur σ^{54} -dépendant situé en amont de *hypA*. Un second promoteur situé à l'intérieur du gène *hypA* dépend de Fnr et est reconnu par le facteur σ^{70} . En condition de croissance non fermentative où HYD1 et HYD2 sont exprimées, ce promoteur permet la transcription de *hypBCDE* nécessaire pour la maturation des hydrogénases 1 et 2 (Messenger et Green, 2003).

1.5 Le métabolisme de l'hydrogène chez *R. eutropha* H16

R. eutropha H16 est gram-négative et chémolithotrophe facultative. Elle croît avec différents sucres et peut utiliser l'oxygène, le nitrate ou le nitrite comme accepteur d'électrons. L'énergie dérivée de l'oxydation de l'hydrogène est couplée avec l'assimilation du CO₂. L'oxydation de l'hydrogène est aussi une source d'énergie et de pouvoir réducteur lorsque la bactérie croît en présence d'une source de carbone faible en énergie (Friedrich et Schwartz 1993).

1.5.1 Les hydrogénases de *R. eutropha* H16

R. eutropha H16 a deux [NiFe]-hydrogénases qui catalysent l'oxydation du H₂ : l'une membranaire (MBH) et l'autre cytoplasmique NAD-dépendante (SH).

MBH est composée d'une grande sous-unité de 60 kDa et d'une petite sous-unité de 30 kDa (Schink et Schlegel, 1979). Les électrons produits par MBH sont transférés au cytochrome *b* de la chaîne respiratoire (Bernhard et collab., 1997). La réaction catalysée par MBH crée un gradient électrochimique pour la production d'ATP par phosphorylation oxydative (Friedrich et Schwartz, 1993).

SH catalyse la réduction du NAD. L'enzyme est atypique car elle utilise un donneur d'électron inorganique (H_2) pour réduire le NAD. Le NADH produit est utilisé pour l'assimilation du CO_2 (Bowien et Kusian, 2002). L'activité de SH élimine la nécessité de produire un pouvoir réducteur par un « courant d'électrons inverse » qui dissipe le gradient électrochimique. Cela permet un rendement de biosynthèse par molécule d'hydrogène consommée améliorée. L'enzyme n'est pas essentiel à la croissance autotrophie de *R. eutropha* H16. Par contre, lorsque son activité est abolie, le temps de doublement augmente de 3,6 à 12 h (Tran-Betcke et collab., 1990).

SH a un poids moléculaire approximatif de 175 kDa dans sa conformation native. Elle est composée de 4 sous-unités de 67, 55, 26 et 23 kDa qui forment deux hétérodimères (Schneider, 1976). Le premier dimère est une [NiFe]-hydrogénase et le second une NADH déshydrogénase. La petite sous-unité de l'hydrogénase contient une molécule FMN fixée à un domaine flavodaxine et un seul centre fer-soufre. La grande sous-unité contient les quatre résidus cystéines pour la liaison des métaux qui sont conservés dans les [NiFe]-hydrogénases (Burgdorf et collab., 2002; Massanz et Friedrich, 1999). L'analyse structurale par spectre infra-rouge, indique que le site actif contient quatre ligands CN (fig. 6). L'hétérodimère qui forme la NADH déshydrogénase contient une molécule FMN et des centres fer-soufre (Happe et collab., 2000; Massanz et collab., 1998; van der Linden et collab., 2004b).

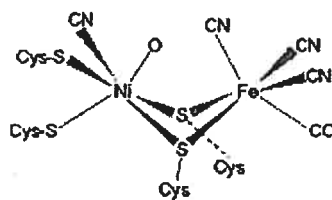


Figure 6. Modèle du site actif de SH de *R. eutropha* H16 (Bleijlevens et collab., 2004)

1.5.2 Organisation génétique

Les gènes des hydrogénases MBH et SH sont contenus dans deux opérons distancés de 50 kb sur le mégaplasme pHG1 de 450 kb (Friedrich et Schwartz, 1993) (fig. 7). Les gènes *hoxK* et *hoxG* codent respectivement pour les petite et grande sous-unités de MBH (Kortluke et collab., 1992). SH est codée par 4 gènes : *hoxF*, *hoxH*, *hoxU* et *hoxY*. Les unités HoxF (67 kDa) et HoxU (26 kDa) forme un dimère catalyseur de la réduction du NAD. Les unités HoxH (55 kDa) et HoxY (23 kDa) constituent respectivement les grande et petite sous-unités de l'hydrogénase (Tran-Betcke et collab., 1990; Schneider, 1976).

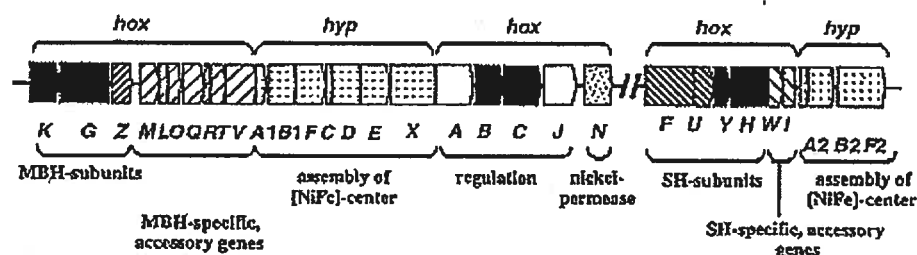


Figure 7. Organisation génétique de la région du chromosome de *R. eutropha* H16 codant pour les gènes *hyp* et *hox* (laboratoire Friedrich)

Récemment, une nouvelle forme de SH, constituée de 6 sous-unités (HoxFUYHI₂), a été isolée (fig. 8). Des expériences de *cross-linking* indiquent que deux unités HoxI forment un homodimère. Dans sa forme tétramérique, SH est activé par le NADH (5 µM) et par le NADPH (50 µM). Dans sa forme hexamérique 25 µM de NADPH est suffisant pour activer l'enzyme. Sur la base de ces observations, il est proposé que le dimère HoxI contient un site d'attachement pour le NADPH (Burgdorf et collab., 2005).

Le produit des gènes *hypA1B1F1CDEX* est impliqué dans la maturation des hydrogénases (se rapporter à la section 1.5.3 de l'introduction) (Dernedde et collab., 1996; Jones et collab., 2004). Le gène *hypX* est absent chez *E. coli*. (Buhrke et Friedrich,

1998). HypX joue un rôle dans la tolérance à l'oxygène. L'activité hydrogénase n'est pas affectée en condition anaérobie dans un mutant déficient pour HypX. Par contre, en présence d'oxygène, l'activité est inhibée. De plus un des quatre ligands CN est absent (Bleijlevens et collab., 2004). Une mutation affectant les gènes *hypA2B2F2* peut être complémenter par l'expression des gènes *hypA1B1F1* et inversement (Wolf et collab., 1998).

SH et MBH ont chacune un protéase spécifique, respectivement HoxW et HoxM, qui clive le peptide C-terminal de leur grande sous-unité (Thiemermann et collab., 1996; Bernhard et collab., 1996). Les produits des gènes *hoxABCJ* sont impliqués dans la régulation de la transcription des hydrogénases en réponse à la présence d'hydrogène (Schwartz et collab., 1999).

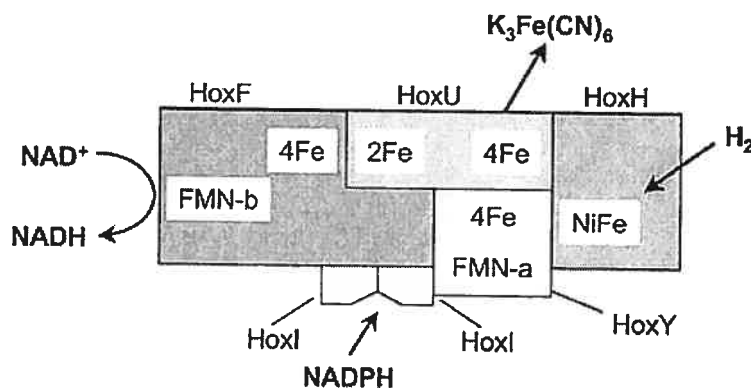


Figure 8. Représentation schématique de SH de *R. eutropha* H16 (Burgdorf et collab., 2005)

1.5.3 Régulation de l'expression de SH et MBH

Les hydrogénases SH et MBH sont transcrites de manière coordonnée. La transcription à partir du promoteur de MBH génère un transcrit d'une longueur de 16 903 nt contenant les gènes structuraux *hoxKG*, les gènes de maturation *hypA1B1FCDEX* et les gènes de régulation *hoxABCJ* (Schwartz et collab., 1999). La transcription de l'opéron *hoxS* (*hoxFUYH*) génère un ARN de 5 000 nt (Tran-Betcke et collab., 1990).

L'expression des gènes en réponse à la présence d'hydrogène est régulée au niveau de la transcription par un mécanisme homologue aux régulateurs des systèmes à deux composants constitués d'une protéine histidine kinase, d'un capteur de stimulus, et d'un régulateur de réponse. Elle implique les protéines HoxB, HoxC, HoxJ et HoxA.

L'activateur de transcription est codé par le gène *hoxA*. HoxA est un régulateur de réponse de la famille NtrC. La protéine est constituée d'un domaine receveur N-terminal, d'un domaine central avec une activité ATPase et d'un domaine de liaison à l'ADN C-terminal (Eberz et Friedrich, 1991). HoxA lie par son motif hélice-boucle-hélice les promoteurs des opérons MBH et SH qui sont dépendants du facteur de transcription sigma54 (Schwartz et collab., 1998). HoxJ est une histidine kinase. La phosphorylation de HoxA sur le résidu Asp55 par la protéine HoxJ bloque la transcription. En présence d'hydrogène, l'activité kinase de HoxJ est inactivée et HoxA est déphosphorylée (Lenz et Friedrich, 1998). Un troisième élément détecte la présence d'hydrogène. Il s'agit d'une [NiFe]-hydrogénase régulatrice composée de la protéine HoxB homologue à la petite sous-unité des hydrogénases et de la protéine HoxC homologue à la grande sous-unité (Lenz et Friedrich, 1998; Kleihues et collab., 2000).

Les hydrogénases de *R. eutropha* H16 sont exprimées en présence d'hydrogène et aussi en présence d'une source de carbone pauvre en énergie, comme le glycérol (Friedrich et Schwartz, 1993). Avec une source de carbone plus riche, comme le succinate, l'expression des hydrogénases est inhibée. Il est possible que l'état énergétique de la cellule agisse sur l'activité de HoxA (Friedrich, 1982).

Les gènes *hox* et *hyp* sont exprimés à faible niveau, même lorsque la synthèse de SH et MBH est réprimée. L'expression constitutive de HoxA, HoxJ, l'hydrogénase régulatrice ainsi que des protéines nécessaires à sa maturation permet de détecter la présence d'hydrogène en tout temps.

1.6 Projet de recherche

Dans cette étude, nous avons, dans un premier temps, étudié le rôle des conditions de culture sur le rendement de la production d'hydrogène. Nous avons évalué les effets des limitations d'azote et de phosphate sur la croissance et la production d'hydrogène de même que le rendement de production de cultures en lot et en continu. Dans un deuxième temps, nous avons tenté d'utiliser une hydrogénase dont le substrat n'était pas le formiate pour améliorer le rendement de la production d'hydrogène. Un système d'expression pour l'hydrogénase NAD-dépendante de *Ralstonia eutropha* H16 a été introduit chez *E. coli*. En outre, l'effet d'une mutation du gène codant pour l'alcool déshydrogénase sur la production d'hydrogène par l'hydrogénase NAD-dépendante exprimée chez *E. coli* a été vérifiée. Le système régulateur du cycle de Krebs ArcAB a aussi été inhibé dans le but de rendre disponible comme substrat un excès de pouvoir réducteur provenant du cycle de Krebs sous la forme de NADH.

2. Matériel et méthode

2.1 Souches bactériennes, plasmides et milieux utilisés

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés dans cette étude sont respectivement présentés dans les tableaux V et VI. Pour la culture des souches d'*E. coli* en bouillon, les milieux LB (10 g de bactotryptone, 5 g d'extrait de levure, 10 g NaCl par L) (Miller, 1992, p. 439), minimal M9 (42,55 mM Na₂HPO₄, 19,22 mM KH₂PO₄, 18,7 mM NH₄Cl, 8,56 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂, 0,8 % glucose, 100 mM MES, pH 6,6) (Miller, 1992, p. 437) ou minimal MOPS (40 mM MOPS, 4 mM tricine, pH 7,4, 1 mM FeSO₄ · 7H₂O, 9,5 mM NH₄Cl, 0,276 mM K₂SO₄, 0,5 mM CaCl₂, 0,525 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1,32 mM K₂HPO₄, 0,8 % glucose) (Neidhardt, 1974) ont été utilisés. Quant à la culture de *R. eutropha* H16, le milieu NB (8 g de bouillon nutritif par L) (Difco) a été utilisé. Pour les expériences nécessitant la croissance hétérotrophe de *R. eutropha* H16, le milieu minimal FGN (63,40 mM Na₂HPO₄, 11,02 mM KH₂PO₄, 37,40 mM NH₄Cl, 0,81 mM MgSO₄, 0,07 mM CaCl₂, 1 µM NiCl₂, 0,2 mM FeCl₃, 0,2 % fructose, 0,2 % glycérol) (Schlegel et collab., 1961) a été utilisé. Le tableau VII présente la concentration des produits ajoutés aux milieux. Les souches ont été mises en collection dans du glycérol 15 % à -20° C.

2.2 Conditions de culture

2.2.1 Culture anaérobie en lot

Pour les études portant sur les effets de la concentration d'azote, les précultures ont été cultivées dans le milieu minimal M9 avec MES, pH 6,6 (sauf indication contraire) en conditions aérobies toute la nuit à 37° C, avec agitation. Après un lavage avec du milieu M9 sans azote, la suspension a été diluée 1/100 dans du M9 avec différentes concentrations de NH₄Cl. Les concentrations finales de NH₄Cl étaient celles-ci : 0, 0,45, 0,9, 1,35, 2,25, 3,15, 9, 13,5 et 18 mM. Pour obtenir des conditions anaérobies, 2 ml de la suspension ont été transférés dans des fioles de 10 ml. Les fioles ont été fermées hermétiquement dans un atmosphère d'argon. Les cultures ont été mises 48 h à 37° C sans agitation.

Tableau V. Génotypes et provenances des souches bactériennes utilisées

Souche	Génotype	Référence
<i>E. coli</i>		
DH5 α	$\phi 80d/lacZ\Delta M15\Delta(lacZYA-argF)$ <i>recA endA hsdR supE</i>	Gibco/BRL
BW545	$\Delta(lacU)169, rpsL$	collection du laboratoire
JW135	BW545 $\Deltahya-Km \Deltahyb-Km$	laboratoire Shanmugam
QC2575	MG1655 $\Delta arcA :: Tc^r$	laboratoire Touati
DC1048	$\Delta adhE, zch :: Tn10$	laboratoire Clark
AK786	S17-1 pCH455 (Ap^r)	laboratoire Friedrich
FTD147	MC4100 $\Delta hyaB \Delta hybC \Delta hycE$	collection du laboratoire
DHAB3	DH5 α portant pAB3	cette étude
DHAB13	DH5 α portant pAB13	cette étude
FTAB1	FTD147 portant pAB15	cette étude
FTAB2	FTD147 $\Delta adhE, zch :: Tn10$	cette étude
FTAB3	FTD147 $\Delta arcA :: Tc^r$	cette étude
FTAB4	FTDAB2 portant pAB15	cette étude
FTAB5	FTDAB3 portant pAB15	cette étude
<i>R. eutropha</i> H16	wild-type, SH ⁺ , MBH ⁺ , RH ⁺ , HoxJ- (hoxJg1264a)	ATC17699

Tableau VI. Caractéristiques et provenances des plasmides utilisés

Plasmide	Caractéristiques	Référence
pBluescript IKS+	Ap^r <i>lacZ</i> , T7 gene 10 promoter, flori	Stratagene
pTRC99A	Ap^r , trc promoteur/opérateur, <i>lacI^Q</i> , ColE1 réplicon	Amman et collab., 1988
pCH455	pKS+ portant un fragment <i>HindIII</i> de 15,0 kb	Massanz et collab., 1998
pAB3	pGE15	cette étude
pAB3	pKS+ portant un fragment 2,6 kb <i>XbaI-BamHI</i> provenant de pCH455	cette étude
pAB13		cette étude
pAB15	pKS+ portant un fragment 15,0 kb <i>XbaI-HindIII</i> pTRC99A portant un fragment 15,0 kb <i>XbaI-HindIII</i> provenant de pAB13	cette étude

Tableau VII. Concentrations des produits ajoutés

Produit	Concentration
Antibiotique	($\mu\text{g/ml}$)
Ap	100
Km	50
Tc	15

Pour les études portant sur les effets de la concentration de phosphate, le milieu M9 a été remplacé par le milieu MOPS. Les concentrations finales de KH_2PO_4 étaient : 0, 0,03, 0,07, 0,13, 0,33, 0,5, 1, 1,5, 2 mM. Les conditions de cultures étaient les mêmes à celles des expériences sur la variation d'azote.

2.2.2 Culture anaérobie en continu

Pour les études portant sur les effets de la limitation d'azote sur une culture anaérobie en continu, 7 L de milieu minimal M9 contenant du MES, pH 6,6 et du NH_4Cl 3,15 mM a été préparé dans une bouteille de 15 L. Les composantes du chémostat (BioFlo C30, New Brunswick Scientific), c'est-à-dire une bouteille de 15 L contenant le milieu de culture, une cuve d'une capacité de 250 ml, une bouteille à déchets de 15 L et des tubes, ont été assemblées et autoclavées. Après la stérilisation de l'appareil, une pompe péristaltique a rempli la cuve. Dans la cuve, le milieu a été inoculé avec une culture de nuit diluée 1/100. La culture a été mise en condition anaérobie sous une atmosphère d'argon renouvelé à 37° C avec agitation. La pompe a été mise en marche à un débit constant. Des échantillons gazeux et liquide ont été prélevés après que 1,5 L de milieu se soit écoulé. Les taux de dilution étaient : 0, 0,1 0,3, 0,5, 0,6 h⁻¹.

Pour les études portant sur les effets de la limitation de phosphate sur une culture en continu, le milieu M9 avec MES a été remplacé par le milieu MOPS contenant du K_2HPO_4 0,13 mM.

2.2.3 Culture des souches de *E. coli* contenant le plasmide pAB15

Pour les études portant sur la production d'hydrogène par l'hydrogénase NAD-dépendante de *R. eutropha* H16 chez *E. coli*, le milieu LB a été utilisé. Les conditions de culture des souches *E. coli* FTD147, FTAB4 et FTAB5 étaient identiques à celles décrites dans la section 2.2.1. La souche *E. coli* FTAB5 a été cultivée dans une atmosphère d'argon et d'air comprimé. Les taux d'aérobiose étaient successivement de 10 %, 30 %, et 50 %.

2.3 Manipulation de l'ADN

2.3.1 Extraction de l'ADN plasmidique

Une culture de nuit de 5 ml a été centrifugée pendant 10 min. Le culot a été resuspendu dans 100 µl de la solution de TEG (25 mM Tris, pH 8, 10 mM EDTA, 50 mM glucose). Le contenu a été transféré dans un microtube de 1,5 ml et laissé sur glace pendant 5 min. Après l'incubation, 200 µl d'une solution fraîche de 0,2 M NaOH, 1 % SDS a été ajouté et mélangé par inversion. Le microtube a été placé sur glace pour une seconde incubation de 5 min. Ensuite, 150 µl d'une solution d'acétate d'ammonium 3 M, pH 4,5 a été ajouté, mélangé par inversion et placé sur glace pour une dernière incubation de 5 min. Suite à une centrifugation à 13 000 rpm de 10 min, le surnageant a été transféré dans un nouveau microtube et 900 µl d'éthanol 100 % a été ajouté. Le microtube a été centrifugé à 13 000 rpm pendant 15 min. Le culot a d'abord été lavé avec 500 µl d'éthanol 70 %. Le culot a ensuite été séché et resuspendu dans 30 µl d'eau distillée stérile contenant 40 µg/ml Rnase.

2.3.2 Amplification par PCR

L'appareil GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer) a été utilisé pour l'amplification de fragments d'ADN. La réaction de PCR a été effectuée dans un volume final de 50 µl qui contenait : 1 µl d'ADN plasmidique, l'enzyme de polymérisation *Pfu* 1,25u/50µl (laboratoire de Patrick Hallenbeck), le tampon *Pfu* avec MgSO₄ 1X (Fermentas), le mélange de dNTP 0.2 mM (Bioshop) et les amorces 1 µM (AlphaDNA). Le protocole de Fermentas a été utilisé.

2.3.3 Digestion par des enzymes de restriction

Les différentes enzymes de restriction (Invitrogen) ont été utilisées selon le protocole du manufacturier. Les digestions enzymatiques ont été effectuées pendant 1 h à 37° C.

2.3.4 Extraction de l'ADN à partir d'un gel d'agarose

La bande d'ADN choisie a été excisée du gel d'agarose 0,8 % et mise dans un microtube. Ensuite, le QIAEX-II Gel Extraction Kit (Qiagen) a été utilisé selon le protocole du fabricant. L'ADN ainsi purifié a été conservé à -20°C .

2.3.5 Méthode de ligation

Le fragment d'ADN et le vecteur ont été digérés avec des enzymes de restriction compatibles puis purifiés à partir d'un gel d'agarose. La T4 ligase d'Invitrogen a été utilisée selon le protocole du fabricant avec un ratio approximatif de 3 :1 (insert : vecteur). Les réactions de ligation ont été effectuées à la température ambiante pendant 1 h.

2.4 Transformation

2.4.1 Préparation de cellules thermocompétentes fraîches

Une culture de nuit a été diluée 1/50 dans 5 ml de LB et incubée 2 h à 37°C . Les cellules ont été gardées sur glace 15 min. et centrifugées à 2500 rpm pendant 15 min à 4°C . Le culot de cellules a été lavé dans 1 ml de CaCl_2 0,1 M froid et transféré dans un microtube froid. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 13000 rpm pendant 5 min à 4°C . Le culot a été resuspendu une dernière fois dans 200 μl de CaCl_2 0,1 M froid. Les cellules ont été conservées sur glace 30 min avant de procéder à la transformation.

2.4.2 Transformation chimique

Un mélange de 100 μl de cellules compétentes et 1 μl d'ADN plasmidique ou 10 μl d'ADN plasmidique produit par ligation a été incubé 15 à 30 min sur glace. Le mélange a été soumis à un choc thermique (2 min à 42°C), puis à une incubation sur glace de 2 min. Ensuite, 500 μl de milieu LB était ajouté et la suspension était incubée pendant 1 h à

37° C avec agitation. 100 µl de cellules transformées ont été étalées sur une gélose LB contenant l'antibiotique approprié. La gélose a été incubée toute la nuit à 37° C. Les colonies ainsi obtenues ont été mises en collection.

2.5 Transduction généralisée

2.5.1 Préparation du lysat phagique de P1*vir* liquide

Une culture de nuit de la souche contenant le marqueur à transduire a été diluée 1/100 dans 5 ml de LB avec 5 mM CaCl₂ et 0,2 % glucose puis incubée 2 h 30 à 37° C sans agitation. Ensuite, 100 µl d'un lysat phagique de P1*vir* (laboratoire Drolet) ayant un titre approximatif de 1×10^9 phage/ml a été ajouté. Après une incubation de 2 h 30 à 37° C avec agitation, 300 µl de chloroforme a été ajouté. La culture a été vortexée avant d'être centrifugée 15 min à 1600 g à 4° C. Quelques gouttes de chloroforme ont été ajoutées au surnageant. Le lysat phagique a été vortexé avant d'être centrifugé 15 min à 1600 g à 4° C. Le lysat phagique ainsi obtenu a été conservé à 4° C (Miller, 1992, p. 268-74).

2.5.2 Transduction avec un lysat phagique de P1*vir*

Une culture de nuit de 1,5 ml a été centrifugée à 13 000 rpm pendant 5 min puis resuspendue dans 450 µl de tampon MC (0,1 M MgSO₄, 5 mM CaCl₂). Un mélange de 100 µl de la suspension et 100 µl du lysat phagique contenant le marqueur à transduire a été incubé 20 min à 37° C dans un premier microtube. Dans un second microtube, un mélange de 100 µl de la suspension et 100 µl du lysat phagique dilué 1/10 a été incubé dans les mêmes conditions. Après avoir ajouté 200 µl de tampon citrate (0,1 M acide citrique, 220 mM NaOH, pH 5,5), la suspension a été centrifugée. Le culot a été resuspendu dans 1ml de milieu LB contenant du sodium citrate 20 mM et incubé 1 h à 37° C. La culture a été centrifugée et le culot a été resuspendu dans 150 µl de milieu LB avec sodium citrate 20 mM. Finalement, les cellules ont été étalées sur un Pétri LB contenant du sodium citrate 20 mM et l'antibiotique approprié. Les colonies ainsi obtenues ont été mises en collection (Miller, 1992, p. 268-74).

2.6 Construction des plasmides et des souches

2.6.1 Construction de pTRC99A-SH+

Pour cloner la région d'environ 15 kb contenant l'opéron *hoxS* provenant de pCH455 dans le plasmide d'expression pTRC99A, un site de restriction *Xba*I a été ajouté en amont de la région codante de l'opéron *hoxS*. Pour ce faire, un fragment de 2,6 kb a été amplifié par PCR avec une amorce en 5' contenant le site *Xba*I et une amorce en 3' s'hybridant à un site *Bam*HI présent dans l'opéron *hoxS*. Les conditions de PCR étaient : 30 cycles de 1 min à 94°C, 30 sec à 55° C et 5 min à 72° C. La séquence 5'-3' de l'amorce utilisé en 5' était : CCTCTAGAATGGATAGTCGTATC (Alpha DNA). La séquence 5'-3' de l'amorce utilisé en 3' était : GATCTTGCCTTCACGGTTCG (Alpha DNA). Le produit de PCR a été purifié à partir d'un gel d'agarose. Le fragment de PCR a été lié à pKS+ préalablement digéré avec *Xba*I-*Bam*HI et purifié. Le produit de ligation (pAB3) a été transformé dans DH5α (DHAB3). Pour reconstruire l'opéron *hoxS*, pCH455 et pAB3 ont été digérés avec *Bam*HI-*Hind*III, purifiés et liés. Le produit de ligation (pAB13) a été transformé dans DH5α (DHAB13). Finalement, la région d'environ 15 kb contenant l'opéron *hoxS* a été clonée sous le contrôle du promoteur de pTRC99A. pTRC99A et pAB13 ont été digérés avec *Xba*I-*Hind*III puis purifiés pour une réaction de ligation. Le produit de ligation (pAB15) a été transformé dans différentes souches d'*E. coli*. La construction du plasmide pAB15 a été vérifiée par PCR. La séquence 5'-3' de l'amorce utilisé en 5' était : CCGACATCATAACGGTTCTGGCAA (Alpha DNA). La séquence 5'-3' de l'amorce utilisé en 3' était : TGTCGAACAGGCCAAACATCCCAT (Alpha DNA).

2.6.2 Construction des souches avec $\Delta adhE$ et $\Delta arcA$

La souche avec une délétion du gène *adhE*, FTAB2, a été obtenue par transduction phagique de la souche FTD147 à partir d'un lysat phagique préparé avec la souche DC1848. La souche FTAB3, mutée pour *arcA* a été obtenue par transduction phagique de la souche FTD147 à partir d'un lysat phagique préparé avec la souche QC2575.

2.7 Méthodes de l'analyse des protéines

2.7.1 Expression et extraction des protéines

La culture pour l'extrait cellulaire de *E. coli* a été préparée à partir d'une préculture diluée 1/40 dans 300 ml de milieu LB avec l'antibiotique approprié et 0,05 mM IPTG. Pour obtenir une condition anaérobie, une bouteille avec un goulot à vis a été complètement remplie. La culture a été incubée toute la nuit à 30° C. Par la suite, la culture a été centrifugée 10 min à 10 000 rpm à 4° C, resuspendue dans 10 ml de tampon Tris 50 mM contenant du glycérol 15 %, pH 7,6 et transférée dans un tube Falcon de 50 ml. Les cellules ont été soniquées 4 fois pendant 30 sec sur glace à une amplitude de 39 %. La suspension a été centrifugée 15 min à 10 000 rpm à 4° C. Le surnageant et le culot resuspendu dans 10 ml de tampon Tris 50 mM contenant du glycérol 15 %, pH 7,6 ont été conservés à -20° C pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS ou utilisés immédiatement pour les expériences portant sur le dosage de l'activité de l'hydrogénase NAD-dépendante.

L'extrait cellulaire de *R. eutropha* H16 a été obtenu à partir d'une culture de nuit diluée 1/100 dans 250 ml de milieu minéral FGN incubée 48 h à 28° C. Les cellules ont été resuspendues dans 10 ml de tampon Tris 50 mM contenant du glycérol 15 %, pH 7,6. Les cellules ont été soniquées 4 fois pendant 30 sec sur glace à une amplitude de 39 %. Après l'étape de sonication, la suspension était centrifugée 45 min à 100 000 g à 4° C. Le surnageant et le culot resuspendu dans 10 ml de tampon Tris 50 mM contenant du glycérol 15 %, pH 7,6 ont été conservés à -20° C pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS ou utilisé immédiatement pour les expériences portant sur le dosage de l'activité de l'hydrogénase NAD-dépendante.

2.7.2 Électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS

L'électrophorèse était effectuée selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1973) avec l'appareil Mini-Protean II Electrophoresis cell (Bio-Rad). La séparation a été faite à partir d'un gel de polyacrylamide 12 % à 200 V pendant 1 h dans un tampon d'électrophorèse (25 mM Tris, 192 mM glycine et de 0,1 % SDS) (Laemmli, 1973). Le marqueur BenchMark Prestained Protein Ladder (Invitrogen) a été utilisé.

2.7.3 Transfert des protéines par Western blot

Les protéines du gel de l'électrophorèse ont été transférées sur membrane de PVDF (Boehringer Mannheim) avec l'appareil Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) selon le protocole du manufacturier (Bio-Rad). L'électroélution était effectuée à 35 V pendant la nuit dans un tampon de transfert (20 % de méthanol, 25 mM Tris, 192 mM glycine) (Bio-Rad).

2.7.4 Hybridation avec des anticorps

La membrane a été lavée deux fois pendant 5 min avec un tampon Tris avec du Tween (TBST) (25 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween). Elle a été bloquée pendant 1 h avec du TBST contenant du lait en poudre 5 % et lavée deux autres fois avec du TBST. L'anticorps primaire anti-SH polyclonal (laboratoire Friedrich) dilué 1/2000 dans 20 ml de TBST contenant du lait en poudre 0,5 % a été laissé 2 h avec agitation. Après deux lavages avec du TBST l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase (Bio-Rad) diluée 1/25 000 dans 20 ml de TBST contenant du lait en poudre 0,5 % a été agité 2 h. La membrane était prête pour la détection après deux lavages avec du TBST et un lavage avec un tampon Tris sans Tween (25 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl) (Yakunin et Hallenbeck, 1998).

2.7.5 Détection de la présence de protéines

Suite à l'hybridation des anticorps primaires et secondaires, les protéines fixées sur la membrane de PVDF ont été détectées avec les réactifs ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences) selon les directives du manufacturier. Un film Kodak BioMax XAR Film (Fisher Scientific) a été exposé à la membrane de 30 sec à 2 min.

2.8 Dosages

2.8.1 Dosage de l'activité enzymatique de SH

L'activité de réduction du NAD des extraits cellulaires préparés selon la méthode décrite dans la section 2.7.1 a été dosée par spectrophotométrie. Du tampon Tris 50 mM, pH 7,6 chauffé à 30° C a été mis dans une fiole. La fiole a été scellée hermétiquement et l'atmosphère ambiante a été suppléée par l'hydrogène pendant 15 min. Une cuvette de 3 ml scellée hermétiquement a été remplie avec 1,9 ml de tampon Tris 50 mM, pH 7,6 saturé avec de l'hydrogène et 20 µg d'extrait cellulaire. La réaction a été initiée en ajoutant 40 µl NAD 48 mM. La réduction du NAD a été mesurée à 365 nm à 30° C.

2.8.2 Dosage de l'hydrogène

La production d'hydrogène a été dosée par chromatographie en phase gazeuse avec un appareil Gas Chromatograph GC-8A (Shimadzu). La température de la colonne (tamis moléculaire de 5 Å) était de 60° C tandis que celle du détecteur était de 110° C, le tout ventilé par de l'argon. Le courant était de 70 mA et la vitesse de l'enregistreur (Linear) de 1 cm/min, pour une atténuation de 8.

Un échantillon de 50 µl provenant de la phase gazeuse des cultures en condition anaérobie (FTD147, JW135, BW135, FTAB1, FTAB4, FTAB5) ou en condition de faible aérobiose (FTAB5), a été prélevé et injecté dans l'appareil. Le temps de rétention de

l'hydrogène était de 18 sec. La quantité d'hydrogène a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage. Pour la culture en lot, l'équation suivante a été utilisée :

$$\text{quantité d'hydrogène (nmol)} = \frac{\text{amplitude (mm)} \times \text{atténuation} \times \text{volume de la phase gazeuse (7,7 ml)}}{\text{volume de l'échantillon (0,05 } \mu\text{l)} \times \text{courbe d'étalonnage (1,4364)}}$$

Pour la culture en continu l'équation suivante a été utilisée :

$$\text{quantité d'hydrogène (nmol) en 24 h} = \frac{\text{amplitude (mm)} \times \text{atténuation} \times \text{débit du gaz (ml/h)} \times 24 \text{ h}}{\text{volume de l'échantillon (0,05 } \mu\text{l)} \times \text{courbe d'étalonnage (1,4364)}}$$

2.8.3 Dosage du glucose

Les cellules ont été centrifugées 5 min à 13 000 g et le surnageant conservé à -20°C . La concentration de glucose a été dosée au centre hospitalier universitaire Sainte-Justine.

3. Résultats

3.1 Production d'hydrogène avec différentes souches et milieu M9 tamponné en condition de croissance en lot

Dans un premier temps, la production d'hydrogène a été étudiée avec des cultures en lot afin de déterminer la souche de *E. coli* qui serait utilisée dans l'ensemble des expériences portant sur les limitations de nutriments et pour déterminer la composition optimale du milieu minimal M9. Les conditions de croissances sont présentées dans la section 2.2.1 du Matériel et méthode. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes effectuées en triplicatas.

3.1.1 Comparaison de la production de H₂ pour les souches *E. coli* BW545 et JW135

Les productions d'hydrogène d'une souche sauvage de *E. coli*, BW545 et d'une souche mutée pour Hyd1 et Hyd2, JW135, ont été comparées. Hyd1 et Hyd2 sont deux hydrogénases exprimées en anaérobie qui consomment de l'hydrogène. La souche JW135 exprime uniquement l'hydrogénase qui est responsable de la production de H₂ (Hyd3) en anaérobie. La souche BW545 est la souche parente de JW135. Elle exprime les trois hydrogénases. Pour vérifier si l'hydrogène produit par Hyd3 était oxydé par Hyd1 et/ou Hyd2, les deux souches ont été cultivées en lot dans une atmosphère d'argon à 37° C sans agitation dans le milieu M9. Les nombres de μmol de H₂ produits après 48 h par ml de culture sont inscrits dans le tableau VIII. Les résultats démontrent que la quantité de H₂ produite par la souche mutante JW135 est supérieure de 53 % à la quantité produite par la souche sauvage BW545.

Tableau VIII. Quantité de H₂ produite par les souches de *E. coli* sauvage BW545 et mutante JW135

Souche de <i>E. coli</i>	H ₂ $\mu\text{mol/ml}$
BW545	7,07 \pm 0,4
JW135	10,85 \pm 1,0

3.1.2 Comparaison de la production de H₂ de la souche *E. coli* JW135 dans les milieux minimaux M9 et M9 tamponné

Les productions en lot d'hydrogène de la souche *E. coli* JW135 dans une atmosphère d'argon avec les milieux M9 et M9 tamponné avec du MES 100 mM, pH 6,6 ont été comparées. Les nombres de μmol de H₂ produits après 48 h à 37° C sans agitation par ml de culture, sont inscrits dans le tableau IX. Les résultats indiquent que la quantité de H₂ produite est supérieure de 56 % dans le milieu avec du tampon MES 100 mM, pH 6,6 en comparaison au milieu M9 sans tampon.

Tableau IX. Quantité de H₂ produite par la souche *E. coli* JW135 dans les milieux M9 et M9 tamponné

Milieu de culture	H ₂ $\mu\text{mol/ml}$
M9 avec H ₂ O	10,85 \pm 1,0
M9 avec tampon MES, pH 6,6	16,91 \pm 1,4

3.2 Effets des concentrations d'azote et de phosphate en condition de croissance en lot

Après avoir déterminé que l'inactivation de Hyd1 et Hyd2 et l'ajout du tampon MES dans le milieu M9 tamponné augmentaient la production de H₂, des expériences portant sur les effets de la concentration de nutriments ont été effectuées. Les effets des concentrations d'azote (NH₄Cl) ou de phosphate (KH₂PO₄) sur la croissance en lot, la production de H₂ et le rendement de la production de H₂ ont été étudiés chez la souche *E. coli* JW135. Le milieu MOPS plutôt que le milieu M9 tamponné a été utilisé pour les expériences sur les effets de la concentration de phosphate parce que la concentration bactérienne variait d'un essai à l'autre lorsque la concentration de phosphate du milieu M9 était faible (données non présentées). Les expériences ont été effectuées selon les conditions de croissance décrites dans la section 2.2.1 du Matériel et méthode. Chaque

expérience a été répétée au moins trois fois. Les résultats rapportés représentent la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes effectuées en triplicatas.

3.2.1 Effets de la concentration d'azote

La croissance de la souche *E. coli* JW135 en lot dans une atmosphère d'argon avec le milieu M9 a été étudiée par spectrophotométrie pour déterminer la concentration d'azote (NH_4Cl) limitante. La densité optique a été mesurée après 48 h à 37° C sans agitation. Les résultats pour les différentes concentrations d'azote utilisées sont présentés dans la figure 9. Le graphique montre que la concentration bactérienne augmente entre 0 et 9 mM NH_4Cl et qu'un plateau se forme entre 9 et 18 mM NH_4Cl . L'azote est donc limitant pour les concentrations inférieures à 9 mM NH_4Cl . La DO_{550} maximale atteinte est de 1,7.

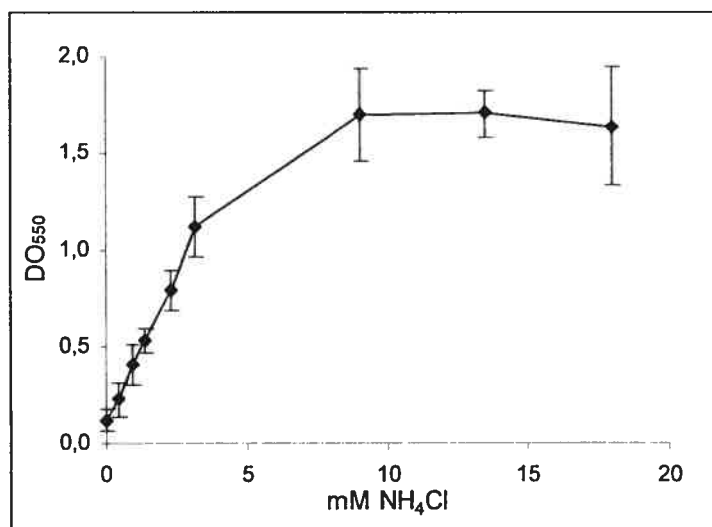


Figure 9. Croissance en lot de la souche *E. coli* JW135 en fonction de la concentration d'azote

En plus de la croissance, la quantité de H_2 produite en lot par la souche JW135 dans une atmosphère d'argon avec le milieu M9 a été mesurée par CG après 48 h à 37° C sans agitation. La figure 10 montre le nombre de μmol de H_2 produit par ml de culture pour

chaque concentration d'azote utilisée. La quantité de H_2 produite est dépendante de la concentration d'azote lorsque celui-ci est limitant pour la croissance, soit entre 0 et 3,15 mM NH_4Cl . Entre 3,15 et 18 mM NH_4Cl , la quantité de H_2 produite augmente légèrement. La quantité maximale de H_2 produite est de 25,30 μmol .

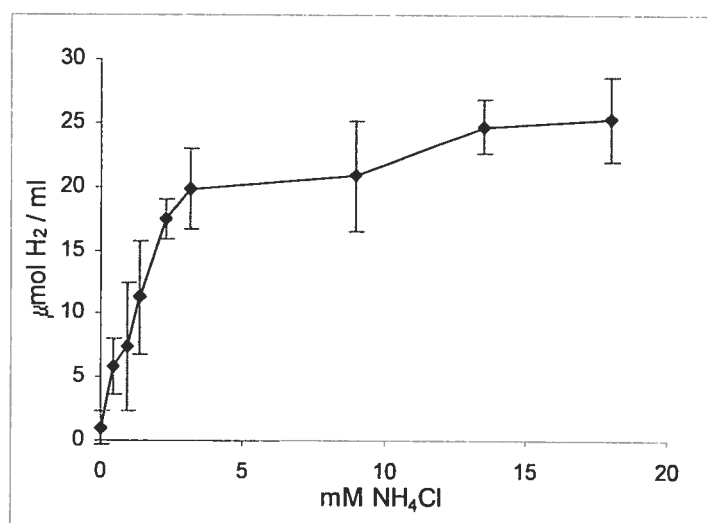


Figure 10. Quantité de H_2 produit par la souche *E. coli* JW135 en lot en fonction de la concentration d'azote

Pour vérifier si la production de H_2 est proportionnelle à la concentration bactérienne, le rapport entre la quantité de H_2 produite par ml de culture et la densité optique a été calculé. Les résultats de la figure 11 montrent que ce n'est pas le cas. En effet, la quantité de H_2 produite est supérieure entre 0,45 et 3,15 mM NH_4Cl , c'est-à-dire lorsque l'azote est limitant pour la croissance.

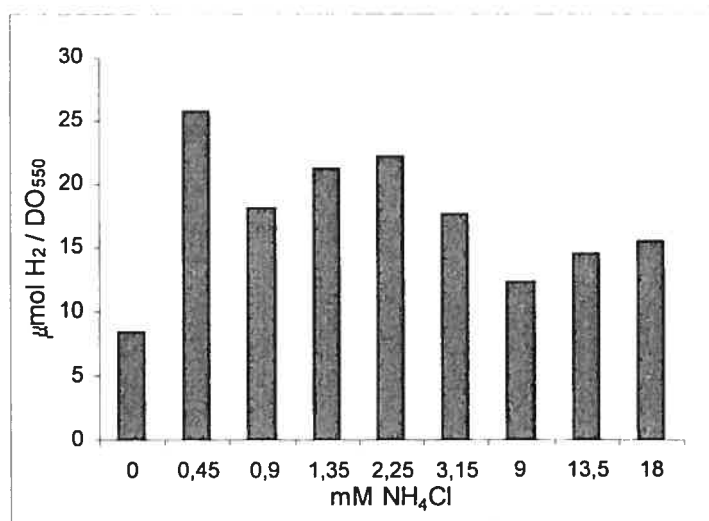


Figure 11. Quantité de H₂ produite par la souche *E. coli* JW135 en lot divisée par la DO₅₅₀ en fonction de la concentration d'azote

L'effet de la concentration d'azote sur le rendement de la souche JW135 a ensuite été étudié. Le rendement a été calculé en divisant la quantité de H₂ produite par la quantité de glucose consommé. La quantité de glucose restant dans le milieu de culture a donc été dosée après 48 h de croissance en lot avec le milieu M9 dans une atmosphère d'argon à 37° C sans agitation (données non présentées). La figure 12 montre le rendement de la production de H₂ pour chaque concentration d'azote utilisée. Les résultats indiquent que le rendement est d'environ 0,6 à 2,25 mM NH₄Cl et aussi lorsque l'azote est en surplus aux concentrations de 13,5 et 18 mM NH₄Cl. Le rendement est supérieur entre 0,45 et 1,35 mM NH₄Cl. Il est le plus élevé à 0,9 mM NH₄Cl. À cette concentration, le rendement de 1,78 se rapproche de la valeur maximale qu'il peut atteindre. Une molécule de glucose peut produire jusqu'à deux molécules de H₂ par la fermentation acide mixte. Un rendement de 2 moles H₂ par mole de glucose consommé est atteint quand la totalité du glucose est utilisé pour la fermentation.

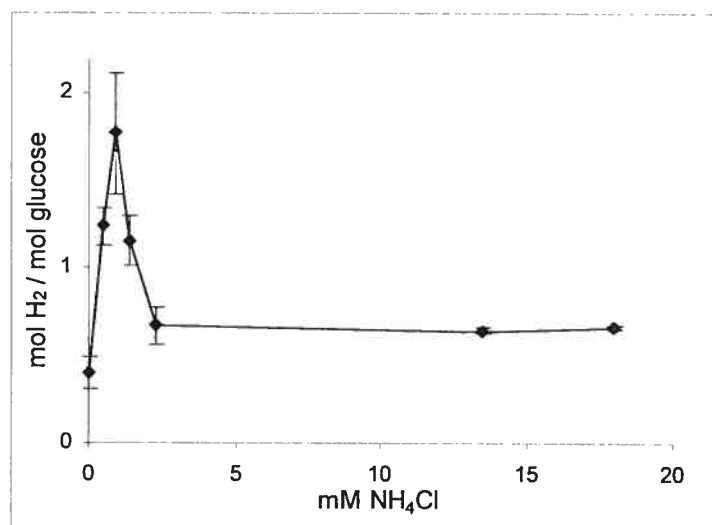


Figure 12. Rendement de la production de H₂ par la souche *E. coli* JW135 en lot en fonction de la concentration d'azote

3.2.2 Effets de la concentration de phosphate

Les effets de la concentration de phosphate (KH₂PO₄) sur la croissance en lot, la production de H₂ et le rendement de la production de H₂ ont aussi été étudiés chez la souche *E. coli* JW135 avec le milieu MOPS. D'abord, la croissance en lot dans une atmosphère d'argon dans le milieu MOPS a été mesurée pour différentes concentrations de phosphate. Les résultats obtenus après 48 h à 37° C sans agitation avec différentes concentrations de phosphate sont présentés dans la figure 13. Les résultats montrent que la densité bactérienne chute lorsque la concentration de phosphate est inférieure à 0,13 mM KH₂PO₄. La concentration de phosphate suffisante pour maintenir la croissance est donc inférieure à celle l'azote. En effet, les concentrations limitantes sont respectivement 0,13 mM KH₂PO₄ pour le phosphate et 9 mM NH₄Cl pour l'azote (fig.9). En outre, la densité bactérienne continue d'augmenter entre 0,13 et 1,5 mM KH₂PO₄. La DO₅₅₀ maximale atteinte est de 1,02.

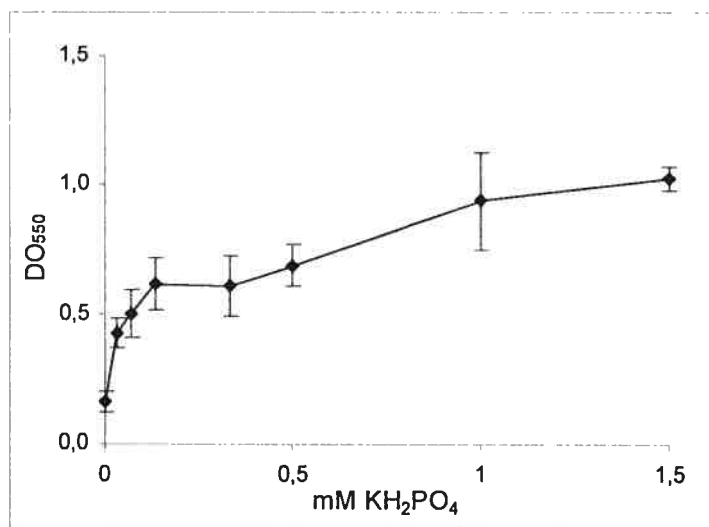


Figure 13. Croissance en lot de la souche *E. coli* JW135 en fonction de la concentration de phosphate

Afin de mesurer l'effet de la concentration de phosphate sur la production de H_2 de la souche JW135, la quantité de H_2 a été prise après 48 h à 37° C sans agitation de culture en lot dans une atmosphère d'argon. La figure 14 montre le nombre de μmol de H_2 produit par ml de culture pour chaque concentration de phosphate utilisée. Les résultats du dosage de l'hydrogène des cultures avec le milieu MOPS sont peu reproductibles. La concentration de phosphate semble avoir peu d'effet sur la quantité H_2 de produite. La production de H_2 est équivalente entre 0,03 mM et 0,07 mM KH_2PO_4 . Entre 0,03 mM et 0,13 mM KH_2PO_4 , la production de H_2 augmente par contre de 47 % (4,56 à 6,69 μmol). Un plateau se forme entre 0,13 et 1,5 mM KH_2PO_4 . La production de H_2 maximale d'une culture avec le milieu MOPS de 7,39 μmol est inférieure à celle d'une culture avec le milieu M9. Avec le milieu M9, elle est plutôt de 25,30 μmol (fig. 10).

Le rapport entre la quantité de H_2 et la densité optique pour les différentes concentrations de phosphate est illustré dans la figure 15. Le graphique indique que la production de H_2

est proportionnelle à la concentration bactérienne puisque le rapport varie peu lorsque le phosphate est limitant ou en surplus.

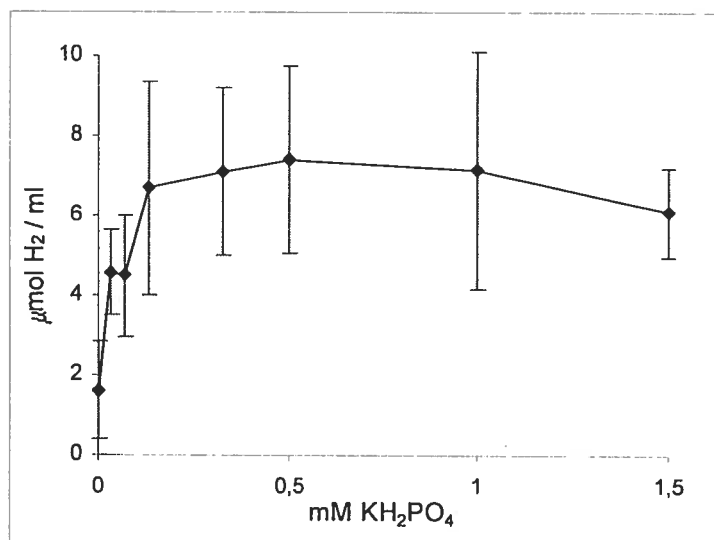


Figure 14. Quantité de H_2 produit par la souche *E. coli* JW135 en lot en fonction de la concentration de phosphate

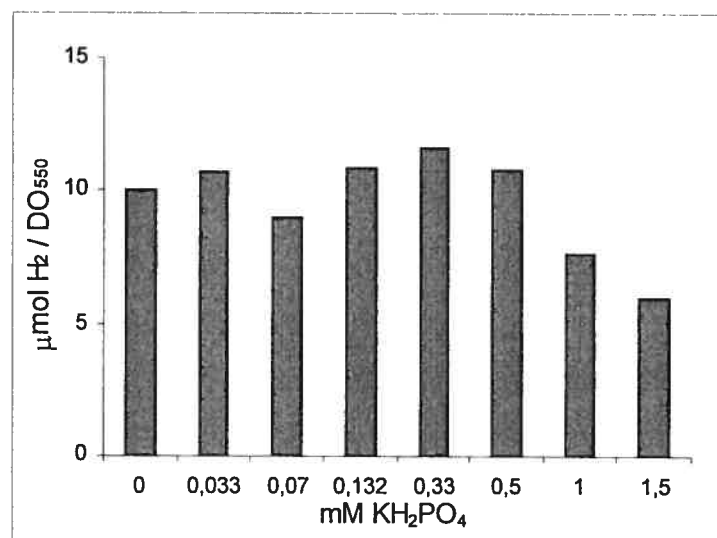


Figure 15. Quantité de H_2 divisé par la DO_{550} en fonction de la concentration de phosphate

Pour vérifier si la concentration de phosphate a un effet sur le rendement de la production de H_2 , la quantité de glucose restant dans le milieu de culture a été dosée (données non présentées). La figure 16 montre le rapport entre la quantité de H_2 produite et la quantité de glucose consommée pour les différentes concentrations de phosphate après 48 h de croissance en lot dans une atmosphère d'argon à 37° C sans agitation de la souche JW135. Le rendement de la production de H_2 a été amélioré en diminuant la concentration de phosphate : de 0,62 et 0,65 avec 0,033 et 0,07 mM KH_2PO_4 . Le meilleur rendement, 0,95, se situe entre 0,132 et 0,5 mM KH_2PO_4 .

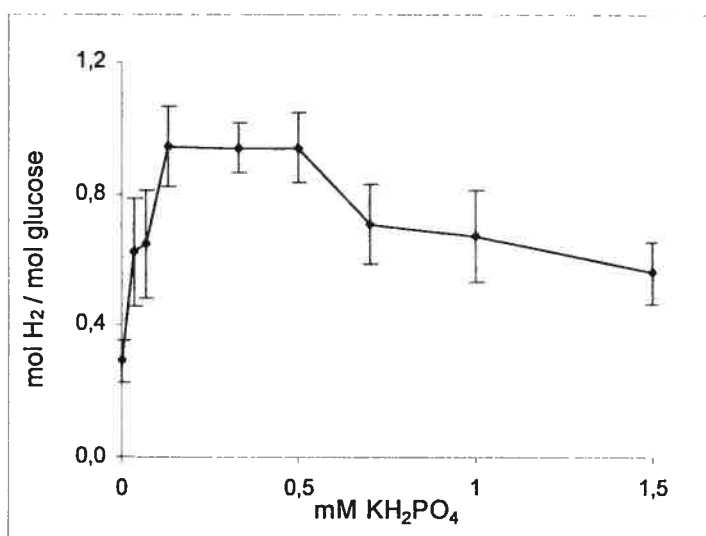


Figure 16. Rendement de la production de H_2 par la souche *E. coli* JW135 en lot en fonction de la concentration d'azote

3.3 Effets des limitations d'azote et de phosphate en condition de croissance en continu

Les effets des limitations d'azote ou de phosphate de cultures en continu sur la croissance, la production de H_2 et le rendement de la production de H_2 ont été étudiés

pour différents taux de dilutions. Chaque expérience a été répétée au moins trois fois. Les conditions de croissance sont décrites dans la section 2.2.2 du Matériel et méthode.

Dans une culture en continu, le milieu de culture frais est ajouté à un taux de dilution constant et un volume équivalent de la suspension bactérienne est retiré. Des échantillons de la phase gazeuse et de la suspension bactérienne sont analysés après qu'au moins 1,5 L de milieu se soit écoulé, pour s'assurer que la culture ait atteint un équilibre dynamique.

3.3.1 Effets du taux de dilution en condition de limitation d'azote

La souche *E. coli* JW135 et le milieu M9 tamponné 3,15 mM NH_4Cl ont été utilisés pour étudier les effets de la limitation d'azote sur la croissance, la production de H_2 et le rendement d'une culture en continu dans une atmosphère d'argon renouvelé avec agitation.

Les résultats rapportés dans la figure 17 montrent la concentration bactérienne de la souche JW135 pour différents taux de dilution. Tel que prévu, la concentration bactérienne diminue lorsque le taux de dilution augmente. À un taux de dilution de $0,6 \text{ h}^{-1}$, la densité optique est de 0,117.

Le nombre de μmol de H_2 produit en 24 h par ml de culture de la souche JW135 pour différents taux de dilutions est illustré dans la figure 18. Les résultats indiquent que, à l'instar de la densité bactérienne, la production d'hydrogène diminue entre 0 et $0,6 \text{ h}^{-1}$. La production d'hydrogène en 24 h au taux de dilution de 0 h^{-1} ($64,45 \mu\text{mol}$) est supérieure à la production d'hydrogène après 48 h d'une culture en lot ($19,75 \mu\text{mol}$) (fig. 10). Les conditions de croissance avec le chimostat sont donc meilleures pour la production d'hydrogène que les conditions de croissance utilisées pour la croissance en lot. Avec le chimostat la culture est agitée, le volume de culture est plus important (250 ml plutôt que 2 ml pour une culture en lot) et l'atmosphère d'argon est renouvelée.

Le rendement de la production d'hydrogène en 24 h de la souche JW135 pour différents taux de dilutions a été calculé. Les résultats sont présentés dans la figure 19. Le rendement est de 2,07 lorsqu'aucun milieu frais n'est ajouté. L'apport de milieu frais diminue le rendement et celui-ci chute à 0,50 à un taux de dilution de 0,1 h⁻¹.

3.3.2 Effets du taux de dilution en condition de limitation de phosphate

Les effets de la limitation de phosphate sur la croissance, la production de H₂ et le rendement de la production de H₂ d'une culture en continu dans une atmosphère d'argon renouvelée avec agitation ont été mesurés chez la souche *E. coli* JW135 dans le milieu MOPS 0,132 mM KH₂PO₄. La croissance de la souche JW135 a été mesurée pour différents taux de dilution. La figure 20 montre que la concentration bactérienne diminue entre 0 et 0,6 h⁻¹ sans toutefois se rapprocher de 0. Le taux de dilution aurait pu être augmenté.

Le nombre de µmol de H₂ produit par ml de culture de la souche JW135 en 24 h pour différents taux de dilution est présenté dans la figure 21. Les résultats indiquent que la production d'hydrogène ne varie pas entre 0,1 et 0,5 h⁻¹ et qu'elle est d'environ 32 µmol entre 0,1 et 0,5 h⁻¹ et de 20 µmol à un taux de dilution de 0,6 h⁻¹.

Le rendement de la production de H₂ en 24 h de la souche JW135 pour différents taux de dilution est présenté dans la figure 22. Le rendement diminue entre les taux de dilution de 0 et 0,6 h⁻¹. Lorsqu'aucun milieu frais est ajouté, le rendement est de 0,99. Il chute à 0,36 à un taux de dilution de 0,1 h⁻¹.

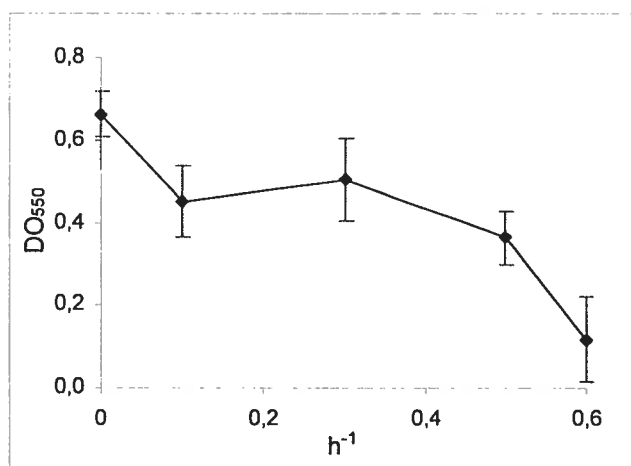


Figure 17. Effet de la limitation d'azote sur la croissance de la souche *E. coli* JW135 en continu en fonction du taux de dilution

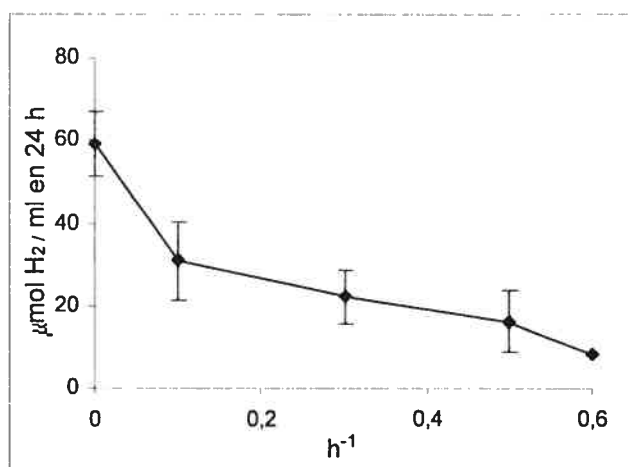


Figure 18. Effet de la limitation d'azote sur la production de H_2 de la souche *E. coli* JW135 en continu en fonction du taux de dilution

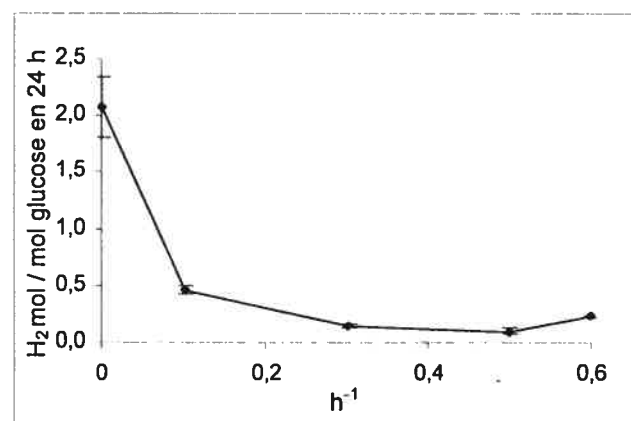


Figure 19. Effet de la limitation d'azote sur le rendement de la production de H_2 de la souche *E. coli* JW135 en continu en fonction du taux de dilution

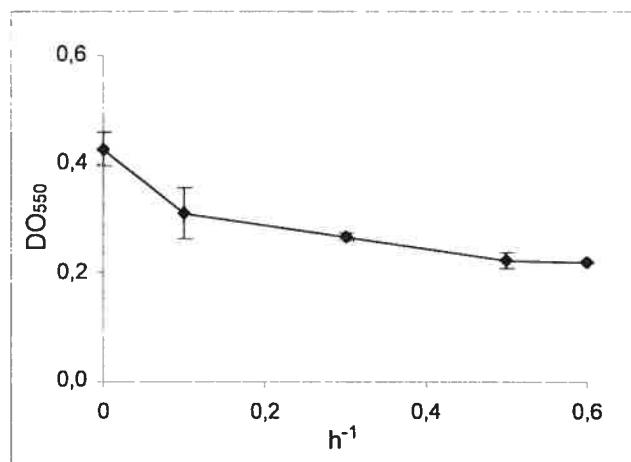


Figure 20. Effet de la limitation de phosphate sur la croissance de la souche *E. coli* JW135 en continu en fonction du taux de dilution

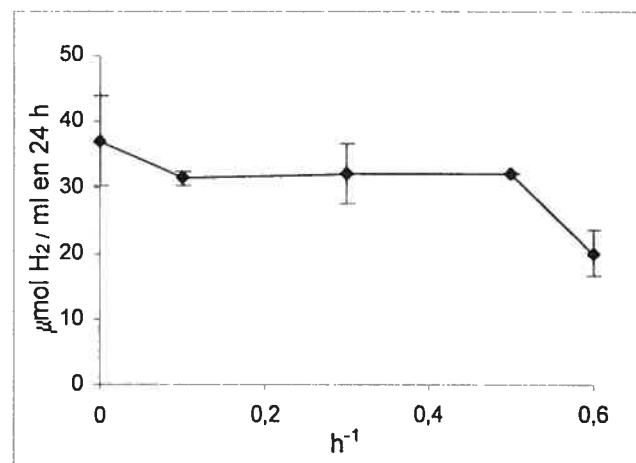


Figure 21. Effet de la limitation de phosphate sur la production de H_2 de la souche *E. coli* JW135 en continu en fonction du taux de dilution

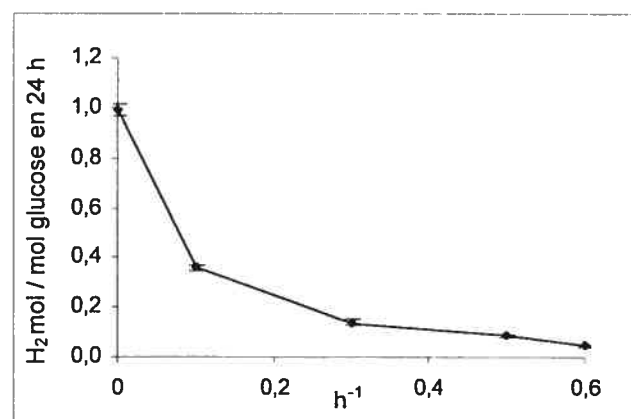


Figure 22. Effet de la limitation de phosphate sur le rendement de la production de H_2 de la souche *E. coli* JW135 en continu en fonction du taux de dilution

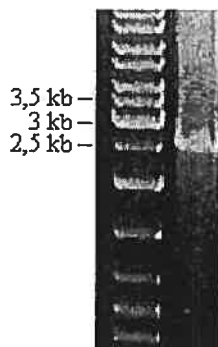
3.4 Clonage des gènes *hoxFUYHWI* et *hypA2B2F2* dans pTRC99A

R. eutropha peut utiliser l'hydrogène comme source d'énergie. Elle exprime une hydrogénase cytoplasmique NAD-dépendante (SH) qui améliore le rendement de la biosynthèse par molécule d'hydrogène consommé. Nous avons tenté d'utiliser cette enzyme pour produire de l'hydrogène chez *E. coli* et ainsi augmenter le rendement de la production d'hydrogène.

Le promoteur de l'opéron *hoxS* codant pour SH est dépendant de l'activité de HoxA. Des études antérieures ont montré que l'opéron n'est pas transcrit chez *E. coli* (Schwartz et collab., 1998). Un système d'expression pour l'hydrogénase NAD-dépendant de *R. eutropha* H16 chez *E. coli* a d'abord été formulé. Pour ce faire, une région d'environ 15 kb comprenant l'opéron *hoxS* (*hoxFUYH*), les gènes *hoxWI* et les gènes de maturation *hypA2B2F2* (fig. 8) a été clonée dans un vecteur adéquat pour l'expression chez *E. coli*.

3.4.1 Insertion du site de restriction *Xba*I

Pour le clonage dans le vecteur d'expression pTRC99A (Amann et collab., 1988), un site de restriction *Xba*I a été introduit en aval du promoteur de *hoxS* par PCR. Un fragment de 2,6 kb de l'opéron *hoxS* a été amplifié à partir du plasmide pCH455 avec une amorce en 5' qui contient le site de restriction adjacent à la séquence ATG du gène *hoxF* (fig. 23). Le produit de PCR a été introduit dans pBluescript préalablement digéré avec *Xba*I-*Bam*HI. Le patron de digestion du plasmide résultant, pAB3, a été vérifié (fig. 24 A).



Puit 1 : Marqueur de poids moléculaire Gene Ruler DNA Ladder Mix
Puit 2 : Fragment de 2,6 kb de l'opéron *hoxS* avec site de restriction *XbaI* amplifié par PCR

Figure 23. Fragment de 2,6 kb de l'opéron *hoxS* de *R. eutropha* H16 avec site de restriction *XbaI* amplifié par PCR

3.4.2 Clonage dans le plasmide d'expression pTRC99A

La séquence d'environ 15 kb contenant l'opéron *hoxS* sans la région promotrice a été reconstruite en liant pCH455 et pAB3 préalablement digérés avec *Bam*HI-*Hind*III. Le patron de digestion enzymatique du plasmide résultant, pAB13, a été vérifié. La digestion de pAB13 avec *XbaI* – *Hind*III a produit un fragment de 14,2 kb correspondant à la séquence clonée et un fragment de 2,9 kb correspondant au plasmide pBluescript (fig. 24 B). La digestion de pAB13 *XbaI* – *Hind*III a produit deux fragments correspondant à la séquence clonée de 11,6 et 2,6 kb et un fragment de 2,9 kb correspondant au plasmide pBluescript (fig. 24 B)

La séquence de 14,2 kb a ensuite été clonée sous le contrôle du promoteur *trc* de pTRC99A en liant pTRC99A et pAB13 préalablement digérés avec *XbaI*-*Hind*III. Un fragment a été amplifié à partir du plasmide résultant, pAB15, afin de vérifier la construction génétique. L'amorce utilisée pour la réaction de PCR lie en 5' une séquence de pTRC99A située 153 bp en amont du site *XbaI*. L'amorce utilisée en 3' lie l'opéron *hoxS* 350 bp en aval du site *XbaI* (fig. 24 C). Le fragment de 503 bp obtenu par la réaction de PCR confirme la construction du plasmide pAB15.

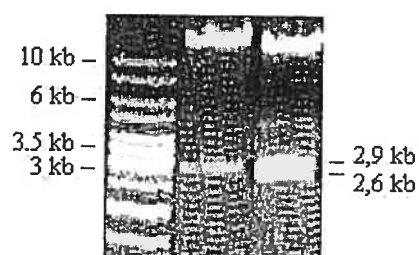


A.

Puit 1 : Marqueur de poids moléculaire Gene Ruler DNA Ladder Mix

Puit 2 : pAB3

Puit 3 : Fragment de 5,5 kb de pAB3 suite à une digestion de pAB3 avec *Bam*HI – *Hind*III



B.

Puit 1 : Marqueur de poids moléculaire Gene Ruler DNA Ladder Mix

Puit 2 : Fragment de 14,2 kb de la région clonée et de 2.9 kb de pBluescript suite à une digestion de pAB13 avec *Xba*I – *Hind*III

Puit 3 : Fragment de 11,6 kb et 2,6 kb de la région clonée et de 2,9 kb de pBluescript suite à une digestion de pAB13 avec *Bam*HI – *Xba*I – *Hind*III



C.

Puit 1 : Marqueur de poids moléculaire Gene Ruler DNA Ladder Mix

Puit 2 : Fragment de 500 bp de pAB15 amplifié par PCR

Figure 24. Vérification de la construction des plasmides
A. pAB3, B. pAB13 et C. pAB15

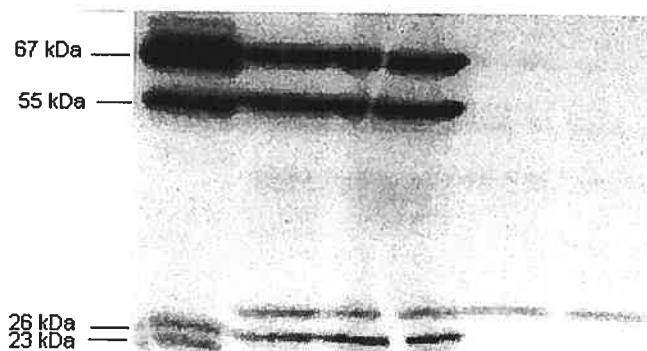
3.5 Production de H₂ par l'hydrogénase NAD-dépendante de *R. eutropha* H16 exprimée chez *E. coli*

Le plasmide pAB15 contenant l'opéron *hoxS* sous le contrôle d'un promoteur *trc* inductible à l'IPTG a été transformé dans différentes souches de *E. coli* pour vérifier l'expression de SH, pour mesurer l'activité de réduction du NAD et la production d'hydrogène par l'enzyme exprimée chez *E. coli*.

3.5.1 Expression de SH chez *E. coli*

L'expression de l'hydrogénase NAD-dépendante de *R. eutropha* H16 chez *E. coli* a été vérifiée par immunobuvardage à partir d'un extrait cellulaire de la souche *E. coli* FTAB1 obtenu selon la méthode décrite dans la section 2.7.1 du Matériel et méthode. La souche d'*E. coli* FTAB1 est le résultat de la transformation du plasmide pAB15 dans la souche FTD147. La souche FTD147, mutée pour les trois hydrogénases, a été utilisée pour éliminer l'activité de production de H₂ par l'hydrogénase 3 et l'activité de consommation par les hydrogènes 1 et 2 lors des expériences portant sur la production de H₂ par SH exprimée chez *E. coli*.

Les résultats d'immunobuvardage de la figure 25 montrent 4 bandes présentes pour les cultures de *R. eutropha* H16 et de *E. coli* FTAB1. Les bandes de 67, 55, 26 et 23 kDa, correspondant aux 4 sous-unités de SH. Les unités HoxF (67 kDa) et HoxU (26 kDa) forme le dimère catalyseur de la réduction du NAD. Les unités HoxH (55 kDa) et HoxY (23 kDa) constituent respectivement les grande et petite sous-unités de l'hydrogénase (Tran-Betcke et collab., 1990; Schneider, 1976). Une quantité importante de protéines se retrouve dans le culot qui contient la fraction membranaire et les déchets cellulaires. Ce résultat est indicateur de la formation de corps d'inclusion.



Puit 1 : surnageant de *R. eutropha* H16

Puit 2 : surnageant de FAB1 avec 0,05mM IPTG; 25-35 μ g de protéine totale

Puit 3 : culot de FAB1 avec 0,05mM IPTG; 25-35 μ g de protéine totale

Puit 4 : surnageant de FTD147 avec 0,05mM IPTG; 25-35 μ g de protéine totale

Puit 5 : culot de FTD147 avec 0,05mM IPTG; 25-35 μ g de protéine totale

Figure 25. Expression de SH chez *E. coli*

3.5.2 Activité enzymatique de SH

L'activité de l'hydrogénase NAD-dépendante des extraits cellulaires de *R. eutropha* H16 et de la souche de *E. coli* FTAB1 a été mesurée par spectrophotométrie. Les détails du dosage sont décrits dans la section 2.8.1 du Matériel et méthode. Brièvement, environ 20 μ g de protéine ont été ajoutés à une cuvette contenant du tampon 50 mM Tris/HCl, pH 8 dans une atmosphère d'hydrogène. La réaction a été initiée par l'ajout de 0,8 mM NAD. Le tableau X montre le nombre de μ mol de NAD réduit par min par mg de protéine totale pour les différentes souches analysées.

Tableau X. Activité de réduction du NAD par différentes souches bactériennes

Souche	μ mol NADH min ⁻¹ mg ⁻¹
<i>R. eutropha</i> H16	5,87 \pm 0,99
<i>E. coli</i> FTD147	0,00
<i>E. coli</i> FTAB1	0,39 \pm 0,19

L'activité enzymatique mesurée pour *R. eutropha* H16 de 5,87 est équivalente à celle citée dans la littérature (Van der Linden et collab., 2004a). Par contre, l'activité enzymatique de *E. coli* FTAB1 est significativement plus faible. La faible activité de l'hydrogénase NAD-dépendante de *R. eutropha* chez *E. coli* peut être due à une maturation incomplète de la protéine. Plusieurs protéines de maturation sont impliquées dans la formation de centre métallique et le clivage protéolytique. Les gènes *hypA2B2F2* codant pour des protéines nécessaires à la maturation de SH ont été inclus dans le système d'expression. Leur présence n'est pas suffisante pour obtenir une forme active de la protéine.

3.5.3 Production de H₂ par SH

La chromatographie en phase gazeuse a été utilisée pour vérifier la capacité de l'enzyme à produire de l'hydrogène exprimée chez *E. coli*. La souche d'*E. coli* FTAB1 a été cultivée en lot dans une atmosphère d'argon sans agitation. L'hydrogène a été quantifié après 48 et 72 h d'incubation à 37° C. Aucun hydrogène n'a été détecté (tableau XI). Le résultat indique que SH exprimée chez *E. coli* ne produit pas d'hydrogène en condition anaérobie malgré la présence des quatre sous-unités détectées par immunobuvardage et le faible niveau d'activité de réduction du NAD mesuré par spectrophotométrie.

3.5.4 Effet des mutations $\Delta adhE$ et $\Delta arcA$ sur la production de H₂ par SH

Pour vérifier si la production d'hydrogène par SH peut être favorisée chez *E. coli* en augmentant la disponibilité du substrat NADH, le plasmide pAB15 a été transformé dans les souches de *E. coli* mutées pour *adhE* ou *arcA*. Les mutants $\Delta adhE$ et $\Delta arcA$ ont été obtenus par transduction généralisée à partir de la souche FTD147.

La voie de production d'éthanol oxyde deux molécules de NADH. SH a été exprimée dans une souche de *E. coli* mutée pour *adhE* pour vérifier si les deux molécules de NADH en surplus pouvaient servir de substrat à SH. La souche résultante FTAB4 a été cultivée en lot dans une atmosphère d'argon sans agitation selon les conditions décrites

dans la section 2.2.3 du Matériel et méthode. L'hydrogène a été quantifié par CG après 48 et 72 h d'incubation à 37° C. Aucune production d'hydrogène n'a pu être détectée.

L'inactivation de ArcA fait fonctionner le cycle de Krebs en anaérobie avec du nitrate comme accepteur d'électrons (Prohl et collab., 1998). En absence d'un accepteur d'électrons, l'accumulation de FADH et de NADH inhibe le cycle. Un faible taux d'oxygénation rétabli l'activité (Alexeeva et collab., 2000). Pour vérifier si le NADH produit par le cycle de Krebs sont disponibles pour la production de H₂ par SH, la souche FTAB5 a été cultivée en lot avec un taux de 20 ou 40 % d'aérobiose selon les conditions décrites dans la section 2.2.3 du Matériel et méthode. L'hydrogène a été quantifié par CG après 48 et 72 h d'incubation à 37° C sans agitation. Aucune production d'hydrogène n'a pu être détectée.

Le tableau XI résume les résultats de production d'hydrogène pour les différentes souches analysées dans cette étude. Aucune production de H₂ n'a été détectée pour les souches mutées pour les trois hydrogénases. Les mutations $\Delta adhE$ et $\Delta arcA$ n'ont pas conféré à SH la capacité de produire de l'hydrogène chez *E. coli*.

Tableau XI. Production de H₂ par différentes souches de *E. coli*

Souche de <i>E. coli</i>	H ₂
BW545	+
JW135	+
FTD147	-
FTAB4	-
FTAB5	-

Légende : + = production d'hydrogène
 - = aucune production d'hydrogène

DISCUSSION

Dans le but d'améliorer le rendement de la production d'hydrogène (mol de H_2 produite par mol de glucose consommé) par la fermentation acide mixte de *E. coli*, nous avons évalué les effets de la limitation de nutriments. D'abord, l'effet de l'inactivation de Hyd1 et Hyd2 sur la production d'hydrogène a été mesurée. *E. coli* exprime en anaérobiose ces deux hydrogénases qui catalysent l'oxydation de l'hydrogène. Pour déterminer si elles consomment de l'hydrogène produit par le complexe FHL, la production d'hydrogène d'une souche sauvage, BW545, a été comparée à celle d'une souche mutée pour Hyd1 et Hyd2, JW135. La quantité de H_2 produite est supérieure de 53 % chez la souche mutante (7,07 μmol pour BW545 et 10,85 μmol pour JW135) (tableau VIII). Le résultat démontre qu'il y a une faible activité de consommation d'hydrogène par Hyd1 et/ou Hyd2 dans les conditions testées. Suite à cette expérience, la souche JW135 a été choisie pour effectuer l'ensemble des expériences portant sur les effets de la limitation de nutriments.

La production d'hydrogène de cultures avec milieux minimaux M9 avec et sans tampon a ensuite été comparée. Afin d'avoir une production optimale d'hydrogène par le complexe FHL, certaines conditions de croissance, dont le taux d'oxygène, la concentration de formiate et la valeur du pH, doivent être maintenues. Un pH acide induit la transcription du complexe FHL (Rossmann, 1991). Par contre si le pH baisse trop, la stabilité des protéines et l'activité enzymatique sont affectées (Axley et collab., 1990). Le tampon MES stabilise le pH entre 6,5 et 7,9. Pour vérifier si la production d'hydrogène s'améliorait avec le tampon, la souche JW135 a été cultivée dans le milieu minimal M9 avec et sans le tampon MES, pH 6,6. La production d'hydrogène d'une culture de la souche *E. coli* JW135 dans le milieu M9 tamponné (16,91 μmol) est supérieure de 56 % à la production d'une culture dans le milieu sans tampon (10,85 μmol) (tableau IX). Étant donné que le tampon MES, pH 6,6 améliore la production d'hydrogène, le milieu M9 utilisé pour effectuer les expériences portant sur la limitation d'azote en contenait.

Un milieu de culture doit contenir une source d'énergie et les éléments essentiels pour soutenir la croissance : du carbone, de l'azote, du soufre, du phosphore, de l'hydrogène et

de l'oxygène car ils sont essentiels pour la synthèse de matériel cellulaire. À cela s'ajoute des alcalins (potassium, sodium), des alcalino-terreux (magnésium, calcium) et d'autres métaux. Lorsque la concentration d'un de ces éléments est insuffisante, de profonds bouleversements physiologiques surviennent. Globalement, les synthèses de ARNr et ARNt sont ralenties au profit de la synthèse de ARNm, la croissance est ralentie et la morphologie cellulaire peut être affectée (Lengeler et collab., 1999, p.733-736). Dans cette étude, les effets des concentrations d'azote et de phosphate sur la croissance en condition de fermentation, la production d'hydrogène et le rendement de la production d'hydrogène ont été évalués.

L'azote constitue 14 % de la masse cellulaire (Lengeler et collab., 1999, p. 96). Il est présent dans les acides aminés, les purines et les pyrimidines. Diminuer la concentration d'azote du milieu devrait limiter la croissance en condition de fermentation. Pour déterminer la concentration à laquelle l'azote devient limitant, la croissance des cultures en lot dans une atmosphère d'argon avec le milieu M9 a été mesurée par spectrophotométrie. Les résultats indiquent que la concentration bactérienne augmente faiblement pour les concentrations d'azote supérieures à 9 mM. L'azote est donc limitant jusqu'à 9 mM NH_4Cl (fig. 9). Entre 9 et 18 mM NH_4Cl , un plateau ne dépassant pas une densité optique de 1,7 se forme. L'épuisement de plusieurs éléments du milieu de croissance, une baisse trop importante du pH ou l'accumulation de déchets toxiques, peuvent être mis en cause pour l'arrêt de la croissance.

La quantité d'hydrogène produite augmente rapidement jusqu'à 3,15 mM NH_4Cl (fig. 10). En calculant la quantité d'hydrogène produite en fonction de la densité optique (fig. 11), nous constatons que la production d'hydrogène n'est pas proportionnelle à la concentration bactérienne. La production est supérieure entre 0,45 et 3,15 mM NH_4Cl . À ces concentrations, la quantité d'hydrogène produite par bactérie est meilleure par rapport à la quantité produite lorsque l'azote est en surplus.

Ensuite, nous avons vérifié l'effet de la limitation d'azote sur le rendement de la production d'hydrogène. Le rendement est calculé en divisant la quantité totale

d'hydrogène produite par la quantité de glucose consommé. Le rendement maximal que peut atteindre la production d'hydrogène par fermentation acide mixte de *E. coli* est de deux molécules de H_2 par molécule de glucose consommé. Pour obtenir cette valeur, la totalité du glucose doit être dégradée en pyruvate par voie de glycolyse. Le pyruvate doit ensuite être dégradé en acétyl-coA et en formiate par la PFL, puis le formiate en H_2 et CO_2 par le complexe FHL. Or, l'utilisation du carbone pour la biosynthèse ainsi que l'utilisation des voies de fermentation alternatives pour maintenir l'équilibre rédox limitent le rendement. Les résultats indiquent que le rendement de production d'hydrogène de la souche *E. coli* JW135 ne dépasse pas 0,6 avec le milieu M9 18 mM NH_4Cl (fig. 12). Le rendement est amélioré en limitant la concentration d'azote. La figure 11 montre que le rendement est optimal à une concentration de 0,9 mM NH_4Cl . À cette concentration d'azote, une plus grande quantité de carbone et d'hydrogène est dirigée vers les voies de fermentation. Le rendement de 1,78 se rapproche de la valeur maximale qu'il peut atteindre. Si la concentration d'azote est plus faible que 0,9 mM NH_4Cl , des mécanismes de survies sont activés. La cellule est dans un état de stress qui affecte le rendement. Lorsque l'azote est en surplus, des voies métaboliques superflues et l'augmentation de la biosynthèse diminuent le rendement de la production d'hydrogène.

La même approche expérimentale a été employée pour évaluer l'effet de la concentration de phosphate sur la croissance, la production d'hydrogène et son rendement. Le phosphore se retrouve dans les acides nucléiques, les phospholipides, les coenzymes et l'ATP. Il constitue 3 % de la biomasse (Lengeler et collab., 1999, p. 96). Les résultats indiquent qu'une concentration beaucoup plus faible de phosphate que d'azote est suffisante pour maintenir la croissance. Le phosphate est limitant pour la croissance jusqu'à une concentration de 0,13 mM KH_2PO_4 (fig. 13). La densité bactérienne chute lorsque le phosphate est inférieur à cette concentration. Par contre, entre 0,13 et 1,5 mM, la densité optique ne forme pas de plateau. Elle atteint 1,02 à 1,5 mM.

La production d'hydrogène augmente de 47 % entre 0,03 et 0,13 mM KH_2PO_4 (fig. 14). Un plateau se forme à partir de 0,13 mM KH_2PO_4 . La figure 15 montre que la production d'hydrogène est proportionnelle à la croissance bactérienne. En effet, le rapport entre la

quantité d'hydrogène produite et la densité optique ne change pas considérablement entre 0 et 0,5 mM KH_2PO_4 (fig.15). Comme pour la limitation d'azote, le rendement est plus bas lorsque la concentration de phosphate est trop faible ou en surplus. Il varie entre 0,6 et 0,95 pour les concentrations analysées (0,033 et 1,5 mM KH_2PO_4) (fig. 16).

La quantité maximale de H_2 produite par ml de culture avec le milieu MOPS est de 7,4 μmol (fig. 14). Avec le milieu M9, elle est de 25,3 μmol (fig. 10). De plus, les écarts types de la production d'hydrogène obtenus avec le milieu MOPS sont considérables tandis que les variations avec le milieu M9 tamponné sont moins importantes. Le milieu M9 est donc préférable pour des études portant sur la production d'hydrogène. Le milieu MOPS a été utilisé parce que les écarts types pour la croissance avec le milieu M9 en condition de limitation de phosphate sont élevés (données non présentées). Le fait que le phosphate sert de tampon dans le milieu M9 peut être mis en cause.

Dans une culture en lot, la concentration bactérienne, des substrats et des produits varient selon la phase de croissance. La phase stationnaire est atteinte lorsque des éléments du milieu de culture sont épuisés. De plus, des produits s'accumulent à des niveaux toxiques. Éventuellement, la lyse bactérienne libère dans le milieu des matières organiques qui peuvent être réutilisées par les cellules. Dans une culture en continu, tous les paramètres sont constants. La culture est approvisionnée de milieu frais à un débit constant et, en même temps, un volume équivalent de la suspension microbienne est retiré. Le volume total demeure inchangé et la culture atteint un équilibre dynamique. Les bactéries se divisent alors à un taux constant dépendant du taux de dilution. La concentration bactérienne est contrôlée par le taux de croissance et la concentration du substrat limitant dans la culture. La concentration du substrat limitant dans le chemostat est dépendante de l'affinité pour le substrat de l'organisme et du taux de dilution. Une culture continue permet d'étudier la relation entre le comportement microbien et les conditions de culture dans des conditions constantes. Les concentrations limitantes d'azote et de phosphate des cultures en continu de *E. coli* JW135 ont été choisies à partir des résultats de la croissance en lot.

La concentration limitante d'azote utilisée pour les expériences en continu est de 3,15 mM NH_4Cl . Tel qu'envisagé, la densité optique diminue lorsque le taux de dilution du milieu M9 augmente (fig. 17). La densité optique baisse jusqu'à 0,149 à 0,6 h^{-1} . La production et le rendement diminuent également lorsque le taux de dilution est augmenté. Les résultats indiquent que le rendement est meilleur lorsque l'apport de milieu frais, et par conséquent d'azote, est diminué. Il chute de 2,07 à 0,50 entre les taux de dilution de 0 à 0,1 h^{-1} . Il aurait été souhaitable de mesurer le rendement à des taux de dilution entre 0 et 0,1 h^{-1} . Il aurait été intéressant de mesurer la quantité des autres produits de fermentation par HPLC. Ainsi, la proportion utilisée de carbone par les différentes voies de fermentation aurait pu être étudiée.

Les effets de la limitation de phosphate sur la croissance, la production d'hydrogène et le rendement ont ensuite été mesurés. La concentration de phosphate utilisée était de 0,13 mM KH_2PO_4 . La concentration bactérienne diminuait légèrement lorsque le taux de dilution a augmenté entre 0 et 0,6 h^{-1} . La quantité d'hydrogène produite, environ 32 μmol , est constante aux taux de dilution se situant entre 0,1 et 0,5 h^{-1} et diminue à 20,14 μmol à un taux de dilution de 0,6 h^{-1} . Par contre, le rendement diminue entre 0,1 et 0,6 h^{-1} , et ce, même si la production d'hydrogène demeure relativement constante pour les différents taux de dilution en raison de la quantité de glucose consommé qui augmente entre 0 et 0,6 h^{-1} (données non présentées). Le rendement de 0,99 lorsqu'aucun milieu frais est ajouté diminue à 0,36 à un taux de dilution de 0,1 h^{-1} . Il aurait aussi été souhaitable de mesurer le rendement à des taux de dilution entre 0 et 0,1 h^{-1} et la quantité des produits de fermentation par HPLC en condition de limitation de phosphate.

Les résultats ont montré que les conditions de culture avec le chimostat favorisent la production d'hydrogène (fig. 10, 14) et le rendement de production d'hydrogène (fig. 12, 16). Lorsque, aucun milieu frais n'est ajouté (taux de dilution 0 h^{-1}), la quantité d'hydrogène (fig. 18, 21) ainsi que le rendement (fig. 19, 22) sont supérieurs par rapport à une culture en lot de 48 h. Les résultats ont aussi démontré que le rendement de la production d'hydrogène est affecté par les limitations de nutriments. On peut conclure qu'en limitant la croissance, le rendement de la production d'hydrogène est amélioré. Il

aurait été intéressant de vérifier la production des autres produits de fermentation. Cela aurait permis de vérifier la distribution du carbone dans les différentes voies de fermentation. Aussi, le rendement de la production d'hydrogène de souches portant des mutations des gènes de la fermentation pourrait être vérifié.

Sur les douze atomes d'hydrogène que contient le glucose, seulement 4 d'entre eux peuvent être utilisés pour la production de H_2 par le complexe FHL. L'avantage d'ajouter une hydrogénase dont le substrat n'est pas le formiate, est de rendre disponible des sources additionnelles d'hydrogène. Nous avons choisi d'exprimer l'hydrogénase NAD-dépendante de *R. eutropha* H16 chez *E. coli* pour utiliser le NADH comme substrat dans la production de H_2 .

Les gènes structuraux des hydrogénases de *R. eutropha* H16 (MBH et SH) sont exprimés de manière coordonnée à partir de promoteurs dépendants du facteur σ^{54} (Romermann et collab., 1989). L'expression est dépendante de l'activation par HoxA (Schwartz et collab., 1998). Schwartz et ses collaborateurs ont démontré que, en plaçant le gène *lacZ* sous le contrôle des promoteurs de MBH ou de SH, ces promoteurs ne sont pas fonctionnels chez *E. coli*. Sans l'activateur HoxA, il n'y a pas de transcription du gène reporteur et lorsque HoxA est exprimée, la transcription demeure très faible (Schwartz et collab., 1998). Des éléments additionnels que l'on retrouve chez *R. eutropha*, mais pas chez *E. coli*, sont nécessaires pour activer la transcription.

Dans le but d'exprimer SH chez *E. coli*, une région de 15 kb contenant les gènes *hoxFUYHWI* et *hypA2B2F2* (Tran-Betcke et collab., 1990) a été placée sous le contrôle du promoteur *trc* inductible à l'IPTG du plasmide pTRC99A (Amann et collab., 1988). La souche FTD147, mutée pour Hyd1, Hyd2 et Hyd3, a été transformée avec le plasmide résultant pAB15, produisant la souche FTAB1. L'inactivation de Hyd1, Hyd2 et Hyd3 permet d'évaluer le rôle de SH seulement dans la production d'hydrogène.

Dans un premier temps, l'analyse par immunobuvardage avec des anticorps polyclonaux dirigés contre SH a été effectuée. Le résultat démontre que les quatre unités de SH, HoxF

(67 kDa), HoxH (55 kDa), HoxU (26 kDa) et HoxY (23 kDa) sont exprimées chez *E. coli* FTAB1 (fig.25). Par contre, une partie importante des protéines détectées se retrouvent dans le culot, qui est composé de la fraction membranaire et des déchets cellulaires. Les conditions expérimentales ne sont donc pas optimales pour la solubilité de la protéine. Les cultures auraient pu être induites moins longtemps à l'IPTG dans le but d'augmenter la solubilité.

Les gènes structuraux *hoxFUYH* sont transcrits en une seule unité. La transcription effectuée à partir du codon de départ situé en amont de *hoxF*, jusqu'au codon d'arrêt situé en aval de *hoxH*, produit un ARNm d'environ 5kb (Tran-Betcke et collab.,1990). Il n'est pas connu si la transcription peut être effectuée chez *E. coli* à partir des promoteurs responsables de la transcription des gènes *hoxWI* et *hypA2B2F2*. Il aurait été souhaitable de vérifier l'expression des ces gènes par immunobuvardage.

Il est possible que les produits de certains gènes de *E. coli* agissent sur la maturation de SH. Les expériences ont été effectuées à partir de cultures mises en condition de fermentation afin de permettre l'expression des gènes impliqués dans la maturation des hydrogénases de *E. coli*. Une étude approfondie sur le rôle des gènes de maturation de *E. coli* dans la maturation de SH pourrait être entreprise. Par exemple, l'interaction entre les protéines du complexe HypC-HypD de *E. coli* et la grande sous-unité de SH pourrait être vérifiée. Ou encore, il pourrait être établi si les protéases HyaD, HybD et HycI impliquées spécifiquement dans la maturation de Hyd1, Hyd2 et Hyd3 respectivement peuvent cliver le peptide C-terminal de la grande sous-unité de SH. En plus des gènes structuraux de SH, l'ensemble des gènes de maturation de *R. eutropha*, *hypA1B1FCDEX*, pourrait être cloné sur un second plasmide d'expression compatible avec pTRC99A. Dans ce cas, leur expression et leur activité chez *E. coli* devraient être vérifiées.

L'activité de réduction du NAD d'un extrait cellulaire de *E. coli* FTAB1 a été vérifiée. Les résultats du dosage démontrent que *E. coli* FTAB1 a une activité fortement réduite en comparaison à l'activité d'un extrait cellulaire de *R. eutropha* H16 (tableau X). Dans cette expérience, l'activité protéique totale a été mesurée. Il aurait été souhaitable de

mesurer l'activité des enzymes purifiés pour comparer l'activité spécifique de l'enzyme exprimé chez *E. coli* FTAB1 à celle de *R. eutropha* H16. Il est connu que *hoxX* est absent du génome de *E. coli*. Chez *R. eutropha* H16, son produit est impliqué dans la tolérance à l'oxygène (Bleijlevens et collab., 2004). Il aurait été nécessaire d'exprimer *hoxX* en plus des gènes structuraux de SH ou de maintenir des conditions anaérobies lors de la préparation de l'extrait cellulaire et du dosage de l'activité de réduction du NAD.

Suite à la culture en lot de la souche FTAB1, aucune production d'hydrogène n'a été détectée par CG (tableau XI). Nous avons tenté de vérifier si l'activité de production de H_2 par l'hydrogénase NAD-dépendante de *R. eutropha* H16 était limitée par la disponibilité du NADH. Dans le but d'augmenter la disponibilité du substrat, la voie de production d'éthanol, qui réduit 4 NADH par molécule de glucose utilisé a été inactivée. Le mutant déficient pour ADH a été généré par transduction à partir de la souche *E. coli* FTD147 qui est mutée pour Hyd1, Hyd2 et Hyd3. Par la suite, le plasmide pAB15 a été introduit, générant la souche FTAB4. Aucune production d'hydrogène par FTAB4 n'a été détectée (tableau XI).

Dans une seconde tentative de produire de l'hydrogène avec SH exprimée chez *E. coli*, le cycle de Krebs, qui produit jusqu'à 8 NADH, a été activé en condition de faible oxygénation. En absence d'oxygène, la synthèse de la plupart des enzymes du cycle sont inhibée par le système de régulation à deux composantes ArcAB. Le niveau des enzymes du cycle de Krebs était rétabli chez un mutant déficient pour ArcA (Lynch et Lin, 1996). Une souche avec une délétion du gène *arcA* et portant le plasmide pAB15, FTAB5, a donc été générée à partir de FTD147. Dans un mutant $\Delta arcA$, en condition anaérobie avec du nitrate, l'activité enzymatique du cycle de Krebs permettait la réduction complète de l'acétyl-coA (Prohl et collab., 1998). Par contre, le cycle n'est pas fonctionnel sans accepteur d'électrons en raison de l'inhibition allostérique des enzymes par le $FADH_2$ et le NADH. Pour permettre la réduction de l'acétyl-coA, la culture de FTAB5 a été mise en condition de faible oxygénation (Alexeeva et collab., 2000). Encore une fois, aucune production d'hydrogène n'a été détectée (tableau XI).

Les expériences portant sur la production d'hydrogène par SH exprimé chez *E. coli* ont été effectuées selon les conditions de culture en lot. Par contre, les résultats des limitations de nutriments ont montré que la production est meilleure avec les cultures dans le chimostat. Il aurait été souhaitable d'étudier la production d'hydrogène des souches de *E. coli* portant le plasmide pAB15 avec des cultures dans le chimostat. L'absence de production d'hydrogène peut être due à une quantité insuffisante de NADH disponible comme substrat. Quantifier par HPLC les différents produits de la fermentation et du cycle de Krebs aurait permis d'étudier les effets des mutations des gènes *adhE* et *arcA* sur la distribution des voies métaboliques. La maturation des hydrogénases est complexe et nécessite plusieurs protéines. Il est fort probable que l'activité enzymatique de SH était trop faible pour produire une quantité d'hydrogène quantifiable par CG à cause d'une maturation incomplète de l'enzyme.

CONCLUSION

Chez *E. coli*, l'hydrogène est produit par la décomposition du produit de fermentation, l'acide formique, en milieu acide par la formiate-hydrogène lyase. La production en masse d'hydrogène par fermentation est malheureusement peu efficace en raison de son faible rendement, éliminant du coup toute utilisation pratique. Comment peut-on augmenter de manière substantielle son rendement? Les multiples voies métaboliques pratiquées par *E. coli* sont dépendantes des conditions du milieu et elles doivent constamment s'y adapter afin de produire le plus d'ATP possible, et d'équilibrer les oxydations par des réductions et de récupérer des intermédiaires utiles aux synthèses. L'étude des conditions de culture, soit les variations de concentration d'azote et de phosphate, a permis d'en évaluer le rôle sur la production d'hydrogène par fermentation acide mixte chez *E. coli*. Les résultats obtenus ont démontré que le rendement de la production d'hydrogène est affecté par les limitations d'azote et de phosphate. Lorsque ceux-ci sont en surplus, le rendement est d'environ 0,6 et peut atteindre jusqu'à 1,78 lorsque l'azote est limitant pour la croissance. Diminuer la concentration de phosphate améliore le rendement jusqu'à 0,95. Par contre, lorsque les concentrations d'azote ou de phosphate sont trop faibles, le rendement est moins bon.

Les hydrogénases catalysent de manière réversible le clivage de l'hydrogène diatomique en deux protons et deux électrons, en présence d'une source donneuse ou acceptrice d'électrons adéquate. Cependant, chacune des hydrogénases a un rôle physiologique défini. *In vivo*, la réaction est irréversible tant pour l'évolution que la consommation d'hydrogène. Chez *R. eutropha*, l'oxydation de H_2 , couplée directement avec la réduction de NAD par une hydrogénase NAD-dépendante, est énergiquement favorable. La réaction permet une croissance améliorée lorsque l'hydrogène est utilisé comme seule source d'énergie. En formulant un système d'expression pour l'hydrogénase NAD-dépendant de *R. eutropha* H16 chez *E. coli*, il serait possible d'utiliser cette enzyme pour produire de l'hydrogène et ainsi augmenter le rendement de la production d'hydrogène. Il serait toutefois nécessaire d'accroître la quantité de NADH disponible pour favoriser la réaction. Malheureusement, l'enzyme exprimée chez *E. coli* ne produit pas d'hydrogène.

Plusieurs facteurs peuvent être mis en cause, dont celui de la maturation incomplète de l'enzyme. L'expression hétérologue d'une hydrogénase chez *E. coli* est une approche qui pourrait être entreprise avec d'autres hydrogénases, si on voulait en accroître la production d'hydrogène. Le principal déficit consisterait à obtenir une forme mature de l'enzyme. Exprimer les gènes de maturation en plus des gènes structuraux pourrait certainement améliorer l'activité enzymatique.

Le développement des sources d'énergie alternatives propres est un grand défi pour la communauté scientifique, mais encore faut-il qu'elles soient abondantes et économiquement rentables, si l'on espère un jour apporter une solution de rechange au pétrole. Le biohydrogène s'avère une avenue énergétique pleine de promesses et, à ce titre, elle est l'objet d'une activité intense de recherche.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, M. W.** 1990. The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta* **1020** : 115-45.
- Adams, M. W. et E. I. Stiefel.** 2000. Organometallic iron: the key to biological hydrogen metabolism. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4** : 214-20.
- Adams, M. W., L. E. Mortenson et H.-S. Chen.** 1981. Hydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **594** : 105-76.
- Andrews, S. C., B. C. Berks, J. McClay, A. Ambler, M. A. Quail, P. Golby et J. R. Guest.** 1997. A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Microbiology* **143** : 3633-47.
- Alam, K. Y. et D. P. Clark.** 1989. Anaerobic fermentation balance of *Escherichia coli* as observed by in vivo nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Bacteriol.* **171** : 6213-17.
- Albracht, S.P.** 1994. Nickel hydrogenases: in search of the active site. *Biochim. Biophys. Acta* **1188** : 167-204.
- Alexeeva, S., B. de Kort, G. Sawers, K. J. Hellingwerf et M. J. T. de Mattos.** 2000. Effects of limited aeration and of the ArcAB system on intermediary pyruvate catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182** : 4934-40.
- Altung, T., K. Knudsen, L. Heerfordt et L. Brondsted.** 1997. Effect of σ^S and the transcriptional activator AppY on induction of the *Escherichia coli* *hya* and *cbdAB-appA* operons in response to carbon and phosphate starvation. *J. Bacteriol.* **179** : 2141-46.
- Amann, E., B. Ochs et K.-J. Abel.** 1988. Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **69** : 301-15.
- Armstrong, F. A.** 2004. Hydrogenase: site puzzles and progress. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8** : 133-40.
- Atanassova, A. et D. B. Zamble.** 2005. *Escherichia coli* HypA is a zinc metalloprotein with a weak affinity for nickel. *J. Bacteriol.* **187** : 4689-97.
- Axley, M.J., D. A. Grahame et T. C. Stradtman.** 1990. *Escherichia coli* formate-hydrogen lyase : purification and properties of the selenium-dependent formate dehydrogenase component. *J. Biol. Chem.* **266** : 13731-36.

- Ballantine, S. P. et D. H. Boxer.** 1985. Nickel-containing hydrogenase isoenzymes from anaerobically grown *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **163** : 454-59.
- Ballantine, S. P. et D. H. Boxer.** 1986. Isolation and characterization of a soluble active fragment of hydrogenase isoenzyme 2 from the membranes of anaerobically grown *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **156** : 277-84.
- Becker, S., D. Vlad et S. Schuster.** 1997. Regulatory O₂ tensions for the synthesis of fermentation products in *Escherichia coli* and relation to aerobic respiration. *Arch. Microbiol.* **168** : 290-96.
- Becker, S., G. Holighaus, T. Gabrielczyk et G. Unden.** 1996. O₂ as the regulatory signal for FNR-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178** : 4515-21.
- Bennett, P. M. et W. H. Holmes.** 1975. Reversible inactivation of isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli* during growth on acetate. *J. Gen. Microbiol.* **87** : 37-51.
- Bernhard, M., B. Benelli, A. Hochkoepler, D. Zannoni et B. Friedrich.** 1997. Functional and structural role of the cytochrome *b* subunit of the membrane-bound hydrogenase complex of *Alcaligenes eutrophus* H16. *Eur. J. Biochem.* **248** : 179-86.
- Bernhard, M., E. Schwarz, J. Rietdorf et B. Friedrich.** 1996. The *Alcaligenes eutrophus* membrane-bound hydrogenase gene locus functions involved in maturation and electron transport coupling. *J. Bacteriol.* **178** : 4522-29.
- Berrios-Rivera, S. J., A. M. Sanchez, G. N. Bennett et K. Y. San.** 2004. Effect of different levels of NADH availability on metabolite distribution in *Escherichia coli* fermentation in minimal and complex media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65** : 426-32.
- Berrios-Rivera, S. J., G. N. Bennett et K.-Y. San.** 2002. The effect of increasing NADH availability on the redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli* chemostat culture. *Metab. Eng.* **4** : 230-37.
- Bleijlevens, B., T. Buhrke, E. van der Linden, B. Friedrich et S. P. Albracht.** 2004. The auxiliary protein HypX provides oxygen tolerance to the soluble [Ni-Fe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha* H16 by way of a cyanide ligand to nickel. *J. Biol. Chem.* **279** : 46686-91.
- Blokesch, M., A. Magalon et A. Bock.** 2001. Interplay between the specific chaperon-like proteins HybG and HypC in maturation of hydrogenase 1, 2, and 3 from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183** : 2817-722.

- Blokesch, M., A. Paschos, A. Bauer, S. Reissmann, N. Drapal et A. Bock.** 2004. Analysis of the transcarbamoylation-dehydration reaction catalyzed by the hydrogenase maturation proteins HypF and HypE. *Eur. J. Biochem.* **271** : 3428-36.
- Blokesch, M., A. Paschos, E. Theodoratou, A. Bauer, M. Hube, S. Huth et A. Bock.** 2002. Metal insertion into NiFe-hydrogenases. *Biochem. Soc. Trans.* **30** : 674-80.
- Blokesch, M. et A. Bock.** 2002. Maturation of [Ni-Fe]-hydrogenases in *Escherichia coli*: the HypC cycle. *J. Mol. Biol.* **324** : 287-96.
- Blokesch, M., M. Rohrmoser, S. Rode et A. Bock.** 2004. HybF, a zinc-containing protein involved in NiFe hydrogenase maturation. *J. Bacteriol.* **186** : 2603-11.
- Blokesch, M., S. P. J. Albracht, B. F. Matzanke, N. Drapal, A. Jacobi et A. Bock.** 2004. The complex between hydrogenase-maturation proteins HypC and HypD is an intermediate in the supply of cyanide to the active site iron of [Ni-Fe]-hydrogenase. *J. Mol. Biol.* **344** : 155-67.
- Bohm, R., M. Sauter et A. Bock.** 1990. Nucleotide sequence and expression of an operon in *Escherichia coli* formate hydrogenlyase components. *Mol. Microbiol.* **4** : 231-43.
- Bowien, B. et B. Kusian.** 2002. Genetics and control of CO₂ assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*. *Arch. Microbiol.* **178** : 85-93.
- Brondsted, L. et T. Atlung.** 1994. Anaerobic regulation of the hydrogenase 1 (*hya*) operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176** : 5423-28.
- Buhrke, T., B. Bleijlevens, S. P. J. Albracht et B. Friedrich.** 2001. Involvement of *hyp* gene products in maturation of the H₂-sensing [Ni-Fe] hydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* **132** : 7087-93.
- Buhrke, T. et B. Friedrich.** 1998. *hoxX* (*hypX*) is a functional member of the *Alcaligenes eutrophus hyp* gene cluster. *Arch. Microbiol.* **170** : 460-63.
- Burgdorf, T., A. L. De Lacey, B. Friedrich.** 2002. Functional analysis by site directed mutagenesis of the NAD(+)-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* **184** : 6280-88.
- Burgdorf, T., E. van der Linden, M. Bernhard, Q. Y. Yin, J. W. Back, A. F. Hartog, A. O. Muijsers, C. G. de Koster, S. P. Albracht et B. Friedrich.** 2005. The soluble the NAD(+)-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* consists of six subunits and can be specifically activated by NADPH. *J. Bacteriol.* **187** : 3122-32.

- Cangelosi, G. A. et M. L. Wheelis.** 1984. Regulation by molecular oxygen and organic substrates of hydrogenase synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **159** : 138-44.
- Casalot, L. et M. Rousset.** 2001. Maturation of the [NiFe] hydrogenases. *Trends Microbiol.* **9** : 228-37.
- Clark, D. P.** 1989. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **63** : 223-34
- Clark, D. P. et J. E. Cronan.** 1980. *Escherichia coli* mutants with altered control of alcohol dehydrogenase and nitrate reductase. *J. Bacteriol.* **141** : 177-83.
- Compan, I. et D. Touati.** 1994. Anaerobic activation of *arcA* transcription in *Escherichia coli* : roles of Fnr and ArcA. *Mol. Microbiol.* **11** : 955-64.
- Degen, O., M., M. Kobayashi, S. Shimizu.** 1999. Selective transport of divalent cations by transition metal permease: the *Alcaligenes eutrophus* HoxN. And the *Rhodococcus rhodochrous* NhlF. *Arch. Microbiol.* **171** : 139-45.
- de Graef, M. R., S. Alexeeva, J. L. Snoep et M. J. T. de Mattos.** 1999. The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181** : 2351-57.
- Dernedde, J., T. Eitinger, N. Patenge et B. Friedrich.** 1996. *hyp* gene products in *Alcaligenes eutrophus* are part of a hydrogenase maturation system. *Eur. J. Biochem.* **235**: 351-58.
- DOE/EIA.** 2000. Long term world oil supply (A resource based/production path analysis. <<http://eia.gov/>>, (Page consultée le 21 juillet 2005).
- Drapal, N. et A. Bock.** 1998. Interaction of the hydrogenase accessory protein HypC with HycE, the large subunit of *Escherichia coli* hydrogenase 3 during enzyme maturation. *Biochemistry* **37** : 2941-48.
- Drapal, N et G. Sawers.** 1995. Purification of ArcA and analysis of its specific interaction with the *pfl* promoter-regulatory region. *Mol. Microbiol.* **16** : 597-607.
- Dubini, A., R. L. Pye, R. L. Jack, T. Palmer et F. Sargent.** 2002. How bacteria get energy from hydrogen : a genetic analysis of periplasmic hydrogen oxidation in *Escherichia coli*. *Int. J. Hydrogen Energy* **27** : 1413-20.
- Dunn, S.** 2002. Hydrogen futures : toward a sustainable energy system. *Int. J. Hydrogen Energy* **27** : 235-64.

- Eberz, G., C. Hogrefe, C. Kortlüke, A. Kamienski et B. Friedrich.** 1986 Molecular cloning of structural and regulatory hydrogenase (*hox*) genes *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Bacteriol.* **168** : 636-41.
- Eberz, G. et B. Friedrich.** 1991. Three *trans*-acting regulatory functions control hydrogenase synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **173** : 1845-54.
- EcoCyc.** 2005a. *E. coli* K-12 Pathway: mixed acid fermentation. <<http://ecocyc.org/>>, (Page consultée le 10 juin 2005).
- EcoCyc.** 2005b. *E. coli* K-12 Pathway: TCA cycle -- aerobic respiration. <<http://ecocyc.org/>>, (Page consultée le 10 juin 2005).
- Eiglmeier, K., N. Honoré, S. Iuchi, E. C. C. Lin et S. T Cole.** 1989. Molecular genetic analysis of Fnr-dependent promoters. *Mol. Microbiol.* **3** : 869-78.
- Eitinger, T. et B. Friedrich.** 1991. Cloning, nucleotide sequence, and heterologous expression of a high-affinity nickel transport gene from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* **266** : 3222-27.
- Eitinger, T. et M.-A. Mandrand-Berthelot.** 2000. Nickel transport systems in microorganisms. *Arch. Microbiol.* **173** : 1-9.
- Evans, D. J. et C. J. Pickett.** 2002. Chemistry and the hydrogenases. *Chem. Soc. Rev.* **32** : 268-75.
- Fontecilla-Camps, J. C., M. Frey, E. Garcin, C. Hatchikian , Y. Montet, C. Piras, X. Vernede et A. Volbeda.** 1997. Hydrogenase: a hydrogen-metabolizing enzyme. What do the crystal structures tell us about its mode of action? *Biochimie* **79** : 661-66.
- Friedrich, B., E. Heine, A. Finck et C. G. Friedrich.** 1981. Nickel requirement for active hydrogenase formation in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **168** : 1144-49.
- Friedrich, B. et E. Schwartz.** 1993. Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs. *Annu. Rev. Microbiol.* **47** : 351-83.
- Friedrich, C. G.** 1982. Derepression of hydrogenase during limitation of electron donors and derepression of ribulosebiphosphate carboxylase during carbon limitation of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **149** : 203-10.
- Fritsche, E, A. Paschos, H. G. Beisel, A. Bock et R. Huber.** 1999. Crystal structure of the hydrogenase maturing endopeptidase HYBD from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **288** : 989-98.

- Garcin, E., X. Vernede, E. C. Hatchikian, A. Volbeda, M. Frey et J. C. Fontecilla-Camps.** 1999. The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure Fold Des.* **7** : 557-66.
- Georgellis, D., A. S. Lynch et E. C. Lin.** 1997. In vitro study of the arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179** : 5429-35.
- Georgellis, D., O. Kwon P. De Wulf et E. C. Lin.** 1998. Sinal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system. *J. Biol. Chem.* **273** : 32864-69.
- Gonzalez, R., H. Tao, K. T. Shanmugam, S. W. York et L. O. Igram.** 2002. Global gene expression differences associated with changes in glycolytic flux and growth rate in *Escherichia coli* during the fermentation of glucose and xylose. *Biotechnol. Prog.* **18** : 6-20.
- Green, J. M., Trageser, S. Six, G. Udden et J. R. Guest.** 1991. Characterization of the FNR protein of *Escherichia coli*, an iron-binding transcriptional regulator. *Proc. Biol. Sci.* **244** : 137-44.
- Guest, J. R.** 1979. Anaerobic growth of *Escherichia coli* with fumarate as terminal electron acceptor. Genetic studies with the menaquinone and fluoracetate resistant mutant. *J. Gen. Microbiol.* **115** : 259-71.
- Guest, J. R. et G. C. Russell.** 1992. Complexes and complexities of the citric acid cycle in *Escherichia coli*. *Curr. Top. Cell. Regul.* **33** : 231-47.
- Gunsalus, R. P.** 1992. Control of electron flow in *Escherichia coli* : coordinated transcription of respiratory pathway genes. *J. Bacteriol.* **174** : 7069-74.
- Gunsalus, R. P. et S. J. Park.** 1994. Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli* : control by the ArcAB and Fnr regulons. *Res. Microbiol.* **145** : 437-50.
- Gupta, S. et D. P. Clark.** 1989. *Escherichia coli* derivatives lacking both alcohol dehydrogenase and phosphotransacetylase grow anaerobically by lactate fermentation. *J. Bacteriol.* **171** : 3650-55.
- Hallenbeck, P. C. et J. R. Benemann.** 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting process. *Int. J. Hydrogen Energy* **27** : 1185-93.
- Hansen, R. G. et U. Henning.** 1966. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity in *Escherichia coli* K12. *Biochim. Biophys. Acta* **122** : 355-58.
- Happe, R. P., W. Roseboom, G. Egert, C. G. Friedrich, C. Manssanz, B. Friedrich et S. P. J. Albracht.** 2000. Unusual FTIR and EPR properties of the H₂-activating

- site of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *FEBS Lett.* **466** : 259-63.
- Haverkamp, G. K., H. Ranke et C. G. Friedrich.** 1995. Kinetic parameters for hydrogen evolution by the NAD-linked hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44** : 514-18.
- Helling, R. B.** 2002. Speed versus efficiency in microbial growth and the role of parallel pathways. *J. Bacteriol.* **184** : 1041-45.
- Hogrefe, C. et B. Friedrich.** 1984. Isolation and characterization of megaplasmid DNA from lithoautotrophic bacteria. *Plasmid* **12** : 161-69.
- Hopper, S. et A. Bock.** 1995. Effector-mediated stimulation of ATPase activity by the sigma 54-dependent transcriptional activator FhlA from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177** : 2798-803.
- Hopper, S., I. Korsa et A. Bock.** 1996. The nucleotide concentration determines the specificity of in vitro transcription activation by the sigma 54-dependent activator FhlA. *J. Bacteriol.* **178** : 199-203.
- Hube, M., M. Blokesch et A. Bock.** 2002. Network of hydrogenase maturation in *Escherichia coli*: role of accessory proteins HypA and HybF. *J. Bacteriol.* **184** : 3879-85.
- Iuchi, S. et E. C. Lin.** 1988. *arcA* (dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** : 1888-92.
- Iuchi, S. et E. C. Lin.** 1992. Mutational analysis of signal transduction by ArcB, a membrane sensor protein responsible for anaerobic repression of operons involved in the central aerobic pathways in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174** : 3972-80.
- Iuchi, S. et E. C. Lin.** 1993. Adaptation of *Escherichia coli* to redox environments by gene expression. *Mol. Microbiol.* **9** : 9-15.
- Jacobi, A., R. Rossmann et A. Bock.** 1992. The *hyp* operon gene products are required for maturation of catalytically active hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **158** : 444-51.
- Jones, A. K., O. Lenz, A. Strack, T. Buhrke, B. Friedrich.** 2004. NiFe hydrogenase active site biosynthesis : identification of Hyp protein complexes in *Ralstonia eutropha*. *Biochemistry* **43** : 13467-77.

- Kato, M., T. Mizuno, T. Shimizu et T. Hakoshima.** 1997. Insights into multistep phosphorelay from the crystal structure of the C-terminal Hpt domain of ArcB. *Cell* **88** : 717-23.
- Kang, Y., K. D. Weber, Y. Qiu et P. J. Kiley.** 2005. Genome-wide expression analysis indicates that FNR of *Escherichia coli* K-12 regulates a large number of genes of unknown function. *J. Bacteriol.* **187** : 1135-60.
- Knappe, J. et G. Sawers.** 1990. A radical-chemical route to acetyl-CoA : the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **75** : 383-98.
- Keefe, R. G., M. J. Axley et A. L. Harabin.** 1995. Kinetic mechanism studies of the soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Arch. Biochem. Biophys.* **317** : 449-56.
- King, P. W. et A. E. Przybyla.** 1999. Response of *hya* expression to external pH in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181** : 5250-56.
- Kleihues, L., O. L. M. Bernhard, T. Buhrke et B. Friedrich.** 2000. The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [Ni-Fe] hydrogenases. *J. Bacteriol.* **182** : 2716-24.
- Koebmann, B. J., H. V. Westerhoff, J. L. Snoep, D. Nilsson et P. R. Jensen.** 2002. The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J. Bacteriol.* **184** : 3909-16.
- Kortluke, C. et B. Friedrich.** 1992. Maturation of membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Bacteriol.* **174** : 6290-93.
- Kortluke, C., K. Horstmann, E. Schwartz, M. Rohde, R. Binsack et B. Friedrich.** 1992. A gene complex coding of the membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Bacteriol.* **174** : 6277-89.
- Kwon, O., D. Georgellis et E. C. Lin.** 2000. Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the arc two-component system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182** : 3858-62.
- Laemmli, U. K. et M. Favre.** 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* **80** : 575-99.
- Lambden, P. R. et J. R. Guest.** 1976. Mutants of *Escherichia coli* K12 unable to use fumarate as an anaerobic electron acceptor. *J. Gen. Microbiol.* **97** : 145-160.
- Lengeler, J. W., G. Drews et H. G. Schlegel.** 1999. *Biology of the prokaryotes*, Oxford, Blackwell Science. p. 96, 733-736.

- Lenz, O. et B. Friedrich.** 1998. A novel multicomponent regulatory system mediates H₂ sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** : 12474-79.
- Levin, D. B., L. Pitt et M. Love.** 2004. Biohydrogen production : prospects and limitations to practical application. *Int. J. Hydrogen Energy* **29** : 173-85.
- Lin, E. C. et S. Iuchi.** 1991. Regulation of gene expression in fermentative and respiratory systems in *Escherichia coli* and related bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **25** : 361-87.
- Liu, X. et De Wulf P.** 2004. Probing the ArcA-P modulon of *Escherichia coli* by whole genome transcriptional analysis and sequence recognition profiling. *J. Biol. Chem.* **279** : 12588-97.
- Lutz, S., A. Jacobi, V. Schlensog, R. Bohm, G. Sawers et A. Bock.** 1991. Molecular characterization of an operon (*hyp*) necessary for the activity of the three hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5** : 123-35.
- Lynch, A. S. et E. C. Lin.** 1996. Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli* : characterization of DNA binding at target promotor. *J. Bacteriol.* **178** : 6238-49.
- Maier, T., F. Lottspeich et A. Bock.** 1995. GTP hydrolysis by HypB is essential for nickel insertion into hydrogenases of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **230** : 133-38.
- Magalon, A., M. Blokesch, E. Zehelein et A. Bock.** 2001. Fidelity of metal insertion into hydrogenases. *FEBS Letters* **499** : 73-76.
- Magalon, A. et A. Böck.** 2000. Analysis of the HypC-HypC-E complex, a key intermediate in the assembly of the metal center of the *Escherichia coli* hydrogenase 3. *J. Biol. Chem.* **275** : 21114-20.
- Massanz, C. et B. Friedrich.** 1999. Amino acid replacements at the H₂-activating site of the NAD-reducing hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*. *Biochemistry* **38** : 14330-37.
- Massanz, C., S. Schmidt et B. Friedrich.** 1998. Subforms and in vitro reconstitution of the NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **180** : 1023-29.
- Massanz C., V. M. Fernandez et B. Friedrich.** 1997. C-terminal extension of the H₂-activating subunit, HoxH, directs maturation of the NAD-reducing hydrogenase in *Alcaligenes eutrophus*. *Eur. J. Biochem.* **245** : 441-48.

- Mat-Jan, F. K., K. Y. Alam et D. P. Clark.** 1989. Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **171** : 342-48.
- Menon, N. K., C. Y. Chatelus, M. Dervartanian, J. C. Wendt, K. T. Shanmugam, H. D. Peck et A. E. Przybyla.** 1994. Cloning, sequencing, and mutational analysis of the *hyb* operon encoding *Escherichia coli* hydrogenase 2. *J. Bacteriol.* **176** : 4416-23.
- Menon, N. K., J. Robbins, J. C. Wendt, K. T. Shanmugam et A. E. Przybyla.** 1991. Mutational analysis and characterization of the *Escherichia coli* *hya* operon, which encodes [NiFe] hydrogenase 1. *J. Bacteriol.* **173** : 4851-61.
- Menon, N. K., J. Robbins, H. D. Peck, C. Y. Chatelus, E. S. Choi et A. E. Przybyla.** 1990. Cloning and sequencing of a putative *Escherichia coli* [NiFe] hydrogenase-1 operon containing six open reading frames. *J. Bacteriol.* **172** : 1969-77.
- Messenger, S. L. et J. Green.** 2003. FNR-mediated regulation of *hyp* expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **228** : 81-86.
- Miller, J. H.** 1992. *A short course in bacterial genetics : a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 268-274, 437 et 439.
- Navarro, C., L. F. Wu et M. A. Mandrand-Berthelot.** 1993. The *nik* operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein transport system for nickel. *Mol. Microbiol.* **9** : 1181-91.
- Neidhardt, F. C.** 1996. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2^e ed., vol. I. Washington, DC, American Society for Microbiology. p. 206-07 et 270.
- Paschos, A., A. Bauer, A. Zimmermann, E. Zehelein et A. Bock.** 2002. HypF, a carbamoyl phosphate-converting enzyme involved in [NiFe] hydrogenase maturation. *J. Biol. Chem.* **277** : 49945-51.
- Pelmont, J.** 1993. *Bactéries et environnement : Adaptations physiologiques*, Grenoble, Presses Universitaires de Grenoble. p. 605 et 613.
- Peters, J. W., W. N. Lanzilotta, B. J. Lemon et L. C. Seefeldt.** 1998. X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science* **282** : 1853-58.
- Pierik, A. J., W. Roseboom, R. P. Happe. K. A. Bagley et S. P. J. Albracht.** 1999. Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [Ni-Fe]-hydrogenases. *J. Biol. Chem.* **274** : 3331-37.

- Porthun, A., M. Bernhard et B. Friedrich.** 2002. Expression of a functional NAD-reducing [Ni-Fe] hydrogenase from the gram-positive *Rhodococcus opacus* in the gram-negative *Ralstonia eutropha*. *Arch. Microbiol.* **177** : 159-66.
- Prohl, C., B. Wackwitz et D. Vlad.** 1998. Functional citric acid cycle in an *arcA* mutant of *Escherichia coli* during growth with nitrate under anoxic conditions. *Arch. Microbiol.* **170** : 1-7.
- Ressmann, S., E. Hochleitner, H. Wang, A. Paschos, F. Lottspeich, R. S. Glass, et A. Bock.** 2003. Taming of a poison : biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands. *Science* **299** : 1067-70.
- Richard, D. J., G. Sawers, F. Sargent, L. McWalter et D. H. Boxer.** 1999. Transcriptional regulation in response to oxygen and nitrate of the operons encoding the [Ni-Fe]-hydrogenases 1 and 2 of *Escherichia coli*. *Microbiol.* **145** : 2903-12.
- Rodrigue, A., D. H. Boxer, M. A. Mandrand-Berthelot et L.-F. Wu.** 1996. Requirement for nickel of the transmembrane translocation of Ni-Fe-hydrogenase 2 in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **392** : 81-86.
- Rossmann, R., G. Sawers et A. Bock.** 1991. Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH : definition of the formate regulon. *Mol. Microbiol.* **5** : 2807-14.
- Rossmann, R., M. Sauter, F. Lottspeich et A. Bock.** 1994. Maturation of the large subunit (HycE) of *Escherichia coli* hydrogenase 3 requires nickel incorporation followed by C-terminal processing at Arg537. *Eur. J. Biochem.* **220** : 377-84.
- Rossmann, R., T. Maier, F. Lottspeich et A. Bock.** 1995. Characterization of a protease from *Escherichia coli* involved in hydrogenase maturation. *Eur. J. Biochem.* **227** : 545-50.
- Salmon, K., S. P., Hung, K. Mekjian, P. Baldi, G. W. Hatfield et R. P. Gunsalus.** 2003. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR. *J. Biol. Chem.* **278** : 29837-55.
- Salmon, K., S. P., Hung, N. R. Steffen, R. Krupp, P. Baldi, G. W. Hatfield et R. P. Gunsalus.** 2005. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12 : effects of oxygen availability and ArcA. *J. Biol. Chem.* **280** : 15084-96.
- San, K.-Y., G. N. Bennett, S. J. Berrios-Rivera, R. V. Vadali, Y.-T. Yang, E. Horton, F. B. Rudolph, B. Sariyar et K. Blackwood.** 2002. Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* **4** : 182-92.

- Sargent, F., S. P. Ballantine, P. A. Rugman, T. Palmer et D. H. Boxer.** 1998. Reassignment of the gene encoding the *Escherichia coli* hydrogenase 2 small subunit--identification of a soluble precursor of the small subunit in a hypB mutant. *Eur. J. Biochem.* **255** : 746-54.
- Sawers, R. G. et A. Bock.** 1988. Anaerobic regulation of pyruvate formate-lyase from *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **170** : 5330-36.
- Sawers, R. G. et D. H. Boxer.** 1986. Purification and properties of membrane-bound hydrogenase isoenzyme 1 from anaerobically grown *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* **156** : 265-75.
- Sawers, R. G., S. P. Ballantine et D. H. Boxer.** 1985. Differential expression of hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli* K-12: evidence for a third isoenzyme. *J. Bacteriol.* **164** : 1324-31.
- Sauter M., R. Bohm et A. Bock.** 1992. Mutational analysis of the operon (*hyc*) determining hydrogenase 3 formation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6** : 1523-32.
- Schink, B., H. G. Schlegel.** 1979. The membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. I. Solubilization, purification, and biochemical properties. *Biochim. Biophys. Acta* **567** : 315-24.
- Schlegel, H. G., H. Kaltwasser et G. Gottschalk.** 1961. Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische untersuchungen. *Arch Mikrobiol.* **38** : 209-22.
- Schneider, K. et H. G. Schlegel.** 1976. Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Biochim. Biophys. Acta* **452** : 66-80.
- Schwartz, E., A. Henne, R. Cramm, T. Eitinger, B. Friedrich et G. Gottschalk.** 2003. Complete nucleotide sequence of pHG1: a *Ralstonia eutropha* H16 megaplasmid encoding key enzymes of H₂-based lithoautotrophy and anaerobiosis. *J. Mol. Biol.* **332** : 369-83.
- Schwartz, E. et B. Friedrich.** 2001. A physical map of the megaplasmid pHG1, one of three genomic replicons in *Ralstonia eutropha*. *FEMS Microbiol. Lett.* **201** : 213-19.
- Schwartz, E., T. Buhrke, U. Gerischer et B. Friedrich.** 1999. Positive transcriptional feedback controls hydrogenase expression in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Bacteriol.* **181** : 5684-92.
- Schwartz, E., U. Gerischen et B. Friedrich.** 1998. Transcriptional regulation of *Alcaligenes eutrophus* hydrogenase genes. *J. Bacteriol.* **180** : 3197-204.

- Self, W. T., A. Hasona et K. T. Shanmugan.** 2004. Expression and regulation of a silent operon, *hyf*, coding for hydrogenase 4 isoenzyme in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186** : 580-87.
- Skibinski, D.A., P. Golby, Y. S. Chang, F. Sargent, R. Hoffman, R. Harper, J. R. Guest, M. M. Attwood, B. C. Berks et S. C. Andrews.** 2002. Regulation of the hydrogenase-4 operon of *Escherichia coli* by the sigma(54)-dependent transcriptional activators FhlA and HyfR. *J Bacteriol.* **184** : 6642-53.
- Suzuki, T.** 1969. Phosphotransacetylase of *Escherichia coli* B, activation by pyruvate and inhibition by NADH and certain nucleotides. *Biochim. Biophys. Acta* **191** : 559-69.
- Tarmy, E. M. et N. O. Kaplan.** 1968. Kinetics of *Escherichia coli* B D-lactate dehydrogenase and evidence for pyruvate-controlled changed in conformation. *J. Biol. Chem.* **243** : 2587-96.
- Thauer, R. K., K. Jungermann et K. Decker.** 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **41** : 100-80.
- Theodoratou, R., R. Hube et A. Bock.** 2005. [NiFe]-hydrogenase maturation endopeptidase : structure and function. *Biochem. Soc. Trans.* **33** : 108-11.
- Thiemermann, S., J. Dornedde, M. Bernhard, W. Schroeder, C. Massanz et B. Friedrich.** 1996. Carboxyl-terminal processing of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* requires the *hoxW* gene product. *J. Bacteriol.* **178** : 2368-74.
- Tran-Betcke, A., U. Warnecke, C. Bocker, C. Zaborosch et B. Friedrich.** 1990. Cloning and nucleotide sequences of the genes for the subunits of NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Bacteriol.* **172** : 2920-29.
- Tsuzuki, M., K. Ishige et T. Mizuno.** 1995. Phosphotransfer circuitry of the putative multi-signal transducer, ArcAB, of *Escherichia coli* : in vitro studies with mutants. *Mol. Microbiol.* **18** : 953-62.
- Uden, G. et J. Bongaerts.** 1997. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli* : energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1320** : 217-34.
- Van der Linden, E., B. W. Faber, B. Bleijlevens, T. Burgdorf, M. Bernhard, B. Friedrich et S. P. J. Albracht.** 2004a. Selective release and function of one of the two FMN groups in the cytoplasmic NAD⁺-reducing [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *Eur. J. Biochem.* **271** : 801-08.

- Van der Linden, E., T. Burgdorf, M. Bernhard, B. Bleijlevens, B. Friedrich et S. P. J. Albracht.** 2004b. The soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* contains four cyanides in its active site, one of which is responsible for the insensitivity towards oxygen. *J. Biol. Inorg. Chem.* **9**: 616–26.
- Vignais, P. M., B. Billoud et J. Meyer.** 2001. Classification and phylogeny of hydrogenase. *FEMS Microbiol. Rev.* **25** : 455-501.
- Volbeda, A., M. H. Charon, C. Piras, E. C. Hatchikian, M. Frey et J. C. Fontecilla-Camps.** 1995. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* **373** : 580-87.
- Wolf, I., T. Buhrke, J. Dornedde, A. Pohlmann et B. Friedrich.** 1998. Duplication of *hyp* genes involved in maturation of [Ni-Fe] hydrogenases in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Arch. Microbiol.* **170** : 451-59.
- Wu, L. F., A. Chanal et A. Rodrigue.** 2000. Membrane targeting and translocation of bacterial hydrogenases. *Arch. Microbiol.* **173** : 318-24.
- Yakunin, A. F. et P. C. Hallenbeck.** 1998. A luminol/iodophenol chemiluminescent detection system for western immunoblots. *Anal. Biochem.* **258** : 146-49.
- Yohannes, E., D. M. Barnhart et J. L. Slonczewski.** 2004. pH-dependent catabolic protein expression during anaerobic growth of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **182** : 192-99.
- Zhang, M., N. Pradel, M.-A. Mandrand-Berthelot, Z. Yu et L. F. Wu.** 2003. Effect of alteration of the C-terminal extension on the maturation and folding of the large subunit of the *Escherichia coli* hydrogenase-2. *Biochimie* **85** : 575-79.

